

1962

M. Olbermann

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Mainz

(Direktor: Professor Dr. med. H. Kliewe)

DER EINFLUSS VON PENICILLIN
AUF FERMENTE DES EIWEISSABBAUS VON
ESCHERICHIA COLI UND BACTERIUM PROTEUS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät der

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
MANFRED OLBERMANN

aus Koblenz



Dekan: Professor Dr. Dr. K. Lang
Referent: Professor Dr. Dr. G. Gillissen
Korreferent: Professor Dr. H. Kliewe
Tag der mündlichen Prüfung: 2. Februar 1962



GESAMTHERSTELLUNG:

Ditters Bürodienst, Mainz, Augustinerstraße 64-66

INHALT

- 1) Einleitung und Ziel der Arbeit
- 2) Der Einfluß von Antibiotika auf Bakterienfermente

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

- 3) Material und Methoden
- 4) Besprechung der Ergebnisse
- 5) Diskussion
- 6) Literatur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

In der Gerichtsmedizin spielt die Bestimmung der Todeszeit bei Ermittlungsvorgängen eine bedeutende Rolle. Die Erfassung von Fehlerquellen bei der Deutung autoptischer Befunde ist daher von großem Interesse. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten (H. - J. Wagner, 60), daß eine kurz vor dem Tode erfolgte Behandlung mit verschiedenen Antibiotika oder Sulfonamiden ein wesentlich verzögertes Auftreten der Fäulnisprozesse verursacht, so daß ein völlig falsches Bild über das tatsächliche Leichenalter entstehen kann. Die Fäulnisvorgänge sind im wesentlichen auf Mikroorganismen zurückzuführen. H. - J. Wagner und G. Gillisen (61) untersuchten, ob die nach Verabreichung von Antibiotika und Sulfonamiden auftretende Verzögerung im Fäulnisprozeß durch eine Hemmung der Fäulnisbakterien bedingt ist. Sie fanden, daß die bei den Tierexperimenten festgestellte Fäulnishemmung nicht durch eine Wachstumshemmung oder gar Abtötung der Erreger zustande kommt. Die Keimbesiedlung der Tierkadaver war nach der Behandlung mit den genannten antibakteriellen Wirkstoffen ähnlich ausgeprägt wie bei den nicht vorbehandelten Kontrolltieren. Damit stand die Frage offen, ob möglicherweise kleine Wirkstoffkonzentrationen, die zwar das Keimwachstum nicht hemmen, so doch bestimmte Fermentsysteme beeinflussen. Es soll daher der Einfluß des Penicillins auf bestimmte Fermente des Eiweißabbaus von *B. proteus* und *E. coli* untersucht werden, da diese Keime bei der Fäulnis eine ausschlaggebende Rolle spielen.

Eiweißkörper oder Proteine sind Polypeptide. Diese sind aus zahlreichen Aminosäuren aufgebaut, wobei die Aminogruppe des einen Moleküls mit der Carboxylgruppe des anderen säureamidartig verknüpft ist. Auf diese Weise entsteht eine aus vielen $-CO-NH-CH-$ Gruppen aufgebaute Kette. Die einzelnen Proteinmoleküle unterscheiden sich durch die Länge der Kette, sowie die Natur und Anordnung der R-Gruppen. Das eine Ende dieser Ketten wird durch eine Amino-, das andere durch eine Carboxylgruppe gebildet.

Der Abbau dieser Eiweißkörper beginnt durch die Proteinasen, Enzyme, welche eine Hydrolyse der Säureamidbindung bewirken, so daß Spaltprodukte entstehen, die noch in die Reihe der Polypeptide gehören. Da der Angriff der Proteinasen im Innern des Moleküls erfolgt, werden sie auch als Endopeptidasen bezeichnet. Die Proteinasen hydrolysieren nicht jede beliebige Peptidbindung, sondern greifen stets an einer für das spezifische Ferment bestimmten Stelle des Moleküls an. Durch die Peptidasen werden die Polypeptide weiter bis zu den einzelnen Aminosäuren aufgespalten. Bei diesen

Fermenten kann man Carboxypeptidasen, die den Abbau stets an der freien Carboxylgruppe beginnen, von den Aminopeptidasen, welche an der Seite der freien Aminogruppe anfangen, unterscheiden. Man bezeichnet diese Enzyme auch als Exopeptidasen, da sie die Polypeptidketten nur an einem der Enden angreifen. Daneben gibt es noch Dipeptidasen, welche ganz spezifische Dipeptide abbauen. Durch diese enzymatischen Vorgänge werden die einzelnen Aminosäuren frei und können weiter aufgespalten werden.

Zunächst erfolgt die Abtrennung der Aminogruppe, welche mit einer Oxydation verbunden ist. Als Endprodukte entstehen Ammoniak und die der Aminosäure entsprechende Ketosäure. Das für diesen Prozeß erforderliche Enzym ist die Aminosäureoxydase. Man konnte dieses Ferment unter anderem auch aus *Proteus vulgaris* isolieren (F. Leuthard, 34). Die Desaminierung besteht zunächst in einer Dehydrierung, wobei die der Aminosäure entsprechende Iminosäure entsteht, die jedoch unbeständig ist und in Ammoniak und die entsprechende Ketosäure zerfällt. Basische Aminosäuren und Aminodicarbonsäuren werden nicht auf diese Weise abgebaut.

Neben der Desaminierung ist noch eine Transaminierung möglich, bei der die Aminogruppe einer Aminosäure auf eine Ketosäure übertragen wird. Die Fermente bezeichnet man als Transaminasen oder Aminopherasen.

Die so entstehenden Ketosäuren können in verschiedener Weise reagieren. Sie werden oxydiert und zur Zucker-, Acetonbildung oder zur Bildung höherer Fettsäuren verwandt. Manche gehen auch direkt in den Zitronensäurezyklus über und werden dort abgebaut. Im allgemeinen werden sie jedoch decarboxyliert und in die um ein C-Atom ärmeren Carbonsäuren übergeführt.

Eine weitere wichtige Abbaureaktion der Aminosäuren ist die Decarboxylierung, wobei das um ein C-Atom ärmere Amin entsteht. Dieser Weg spielt vor allem im Bakterienstoffwechsel eine bedeutende Rolle. Die Enzyme, Aminosäuredecarboxylasen, sind in Bakterien weitverbreitet (*E. coli*, *Str. haemolyticus*, *Str. faecalis*, *Cl. septicum*, *Cl. Welchii*, *Proteus vulgaris* usw.) (F. Leuthard, 35). Die entstehenden basischen Stoffe werden unter dem Begriff biogene Amine zusammengefaßt. Diese Amine werden durch Aminoxydasen zu Aldehyden und schließlich zu Carbonsäuren oxydiert. Bei diesem Vorgang entstehen Ammoniak, Wasserstoff und der entsprechende Aldehyd.

Die oben beschriebenen enzymatischen Prozesse, die sich in gleicher Weise bei der Eiweißfäule abspielen, zeigen, daß dabei größere Mengen Ammoniak gebildet werden. Beim Abbau der schwefelhaltigen Aminosäuren entsteht durch die Wirkung der Desulphydrasen Schwefelwasserstoff. In den fol-

genden Untersuchungen werden diese Endprodukte quantitativ bestimmt, da man aus der Änderung der gebildeten Menge rückschließen kann, ob das Penicillin eine Wirkung auf die Fermente hat.

DER EINFLUSS VON ANTIBIOTIKA AUF BAKTERIENFERMENTE

Antibiotika sind Stoffe, welche die für das Bakterienwachstum erforderlichen Prozesse reversibel (Bakteriostase) oder irreversibel (Bakteriocidie) hemmen können. In den meisten Fällen sind diese Effekte auf die Beeinflussung von Enzymreaktionen des betroffenen Organismus zurückzuführen. Nachfolgend soll kurz auf die bisher bekannten Angriffspunkte der Antibiotika bei einzelnen Enzymvorgängen eingegangen werden (L. Mosonyi, 44).

Jacobsohn und Azevedo (28) stellten fest, daß die Wirkung der Saccharase durch Aureomycin gesteigert, durch Erythromycin und Terramycin herabgesetzt wird. Ursache ist die prosthetische Gruppe des Aureomycins, welche Cl-Ionen enthält, die die zur vollen Wirkung der Saccharase notwendigen Mg-Ionen durch Chelatbildung binden.

Die Tätigkeit der Cholinesterase wird nach Jacobsohn und Mirabeau-Cruz (30, 43) durch Streptomycin, Penicillin und die Tetracycline gesteigert. Blaich und Gerlach (8) fanden jedoch einen hemmenden Effekt bei Streptomycin und Penicillin.

Die Wirkung der Phosphatase wird nach Jacobsohn und Mitarbeiter (30, 43) durch Penicillin gesteigert und durch Streptomycin vermindert. Macheboeuf und Gros (38) beobachteten dagegen eine hemmende Wirkung beider Antibiotika, im Gegensatz zum Tyrothricin, welches ihrer Meinung nach das Enzym aktiviert. Die beiden Autoren beschreiben außerdem eine hemmende Wirkung des Streptomycins auf Cis-Aconitase und Fumarsäureoxydase (43).

Streptomycin vermindert nach Jacobsohn und Mirabeau-Cruz (30) die Aktivität der Thiaminase.

Bei Untersuchungen über Lipase entdeckten Crone-Münzenbrock (12), daß Penicillin effektiv ist. Jacobsohn und Azevedo (28) fanden bei Tetracyclinen eine Aktivitätssteigerung.

Bei den Amidasen wird die Urease durch Erythromycin und Aureomycin in Konzentrationen von 10 mg/ml gehemmt und bei Konzentrationen von

5 mg/ml in ihrer Aktivität gesteigert (Jacobsohn und Azevedo, 27). Die Wirkung des Trypsins, einer Protease, wird nach Crone-Münzenbrock (12) von den beiden Antibiotika nur wenig beeinflusst.

Peptidasen (aus dem Pankreas) können bei Anwesenheit von Tetracyclinen und Erythromycin das DL-Leucyl-Glycin nur in vermindertem Maße abbauen (Jacobsohn und Azevedo, 27).

Oxydasen: Sanyal (51) beobachtete eine Steigerung der Aktivität der Katalase durch Streptomycin und eine Hemmung durch Penicillin. Dudani und Krishnamurti (15) fanden, daß die Wirkung der Ascorbinsäureoxydasen durch Terramycin gesteigert, durch Penicillin, Dihydrostreptomycin, Aureomycin, Chloramphenicol und Neomycin gehemmt wird.

Desmolasen: Tetracycline beschleunigen die Bildung der Carboanhydrase bei der alkoholischen Gärung (Jacobsohn und Azevedo, 28).

Die Cocarboxylase ist das Coferment der Decarboxylase. Sie spielt eine wesentliche Rolle im Stoffwechsel der Alpha-Keto-Säuren des Krebs-Zyklus. Karrer und Visconti (31) beobachteten eine hemmende Wirkung des Patulin, die bei einer Konzentration von 0,05 mg/ml beginnt. Wong, Barban und Ajl (62) konnten beweisen, daß Aureomycin, Terramycin und Erythromycin die Oxydation der Tricarboxylsäure und der Alpha-Keto-Glutar-säure hemmen.

Mosonyi (44) zeigte, daß Penicillin die Aktivität der Cholinesterasen sehr unterschiedlich beeinflusst. Er fand eine Hemmung oder eine Steigerung, meist jedoch keine Wirkung. Die Steigerung trat überwiegend bei kleineren Dosen, die Hemmung bei größeren Dosen ein. Die Änderungen laufen jedoch keinesfalls der Konzentration parallel. Die Verschiebung des pH-Wertes ist so gering, daß sie die Abweichung nicht bewirkt haben kann. Kochte man die Penicillinlösung vor Untersuchung der Cholinesteraseaktivität, so traten ähnliche Ergebnisse auf. Danach kann man vermuten, daß die Wirkung des Penicillins auf die Cholinesterase nicht mit der antibiotischen Wirkung identisch ist. Es lag deswegen nahe, den Effekt bestimmten Strukturelementen des Moleküls zuzuschreiben. Mosonyi nimmt an, daß es auf die SH-Wurzeln der Dimethylcysteingruppe ankommt, oder daß eines der während der Inaktivierung des Penicillins entstandenen Abbauprodukte diese chemischen Eigenschaften ebenfalls besitzt.

Beim Streptomycin fand Mosonyi eine Hemmung der Cholinesterase in Abhängigkeit von der Konzentration. Jacobsohn und Mirabeau-Cruz

(30) hatten im Gegensatz dazu eine Erhöhung der Fermentaktivität beobachtet. Beim Aureomycin stellten beide Untersucher einen steigernden Effekt fest.

Phosphatase: Streptomycin bewirkt eine Verminderung der alkalischen Serumphosphataseaktivität (Mosonyi, 44). Eine Erhöhung wird durch Aureomycin verursacht. Diese führt man auf die chelatbildende Wirkung des Medikaments mit den Metallionen zurück.

Terramycin fördert die Wirkung der Oxydasen. Penicillin, Dihydrostreptomycin, Aureomycin, Neomycin und Chloramphenicol hemmen die Vorgänge (15). Beim Streptomycin findet man widersprechende Angaben (15, 51).

Tyrosinase wird nach Mosonyi (44) durch Penicillin und Streptomycin gehemmt, durch Chlortetracyclin nicht beeinflusst und durch Tyrothricin gefördert. Dagegen wirkt das Penicillin durch Bindung der für den enzymatischen Prozeß notwendigen Cu-Ionen an die SH-Gruppe. Streptomycin zeigt eine direkte Enzymhemmung. Tyrothricin bewirkt "mit seinem Tyrosin-Gehalt eine Erhöhung der Menge des Oxydationssubstrates" und dadurch eine Steigerung (Mosonyi).

Wesentlich ist die Wirkung der Antibiotika auf die Fermente, die an der Synthese und dem Abbau der Nukleinsäuren und des Proteins beteiligt sind. In diesem Zusammenhang beschreibt Umbreit (58) einen hemmenden Einfluß des Penicillins auf die Synthese der Nukleinsäuren. Dadurch wird der Aufbau des intrazellulären Proteins verhindert. Streptomycin bildet mit präformierten Nukleinsäuren und Nukleoproteiden unlösliche Komplexe (Dimarko und Baretti, 13) und wird dadurch zum Hindernis für die Zellentwicklung. Die Streptomycinresistenz bei Bakterienstämmen entsteht durch eine Anhäufung von Ribonukleinsäure, die mit dem Antibiotikum unter Bildung eines Komplexes reagiert, wodurch die Depolymerisation verhindert wird (Beljanski, 4). Alexander und Leidy (1) stellten in resistenten Stämmen von *H. influenzae*, Hotchkiss (26) sowie Vaczi und Mitarbeiter (59) bei Pneumokokken den Zusammenhang zwischen Desoxyribonukleinsäureinhalt und Resistenz fest. Beljanski (4) beschreibt die ähnliche Wirkung der resistenten Staphylokokken. Die Antibiotika hemmen also die Funktion der Ribonukleasen.

Bei den bakteriellen Oxydasen beschäftigte man sich vor allem mit der Diaminoxydase und untersuchte, ob die bakterielle Diaminoxydase mit der bei

höheren Organismen auffindbaren übereinstimmt. Roulet und Zeller (50), später Zeller, Owen und Karlson (63) fanden bei Untersuchungen an *M. tuberculosis*, daß beide miteinander verwandt, aber nicht identisch sind. Die Versuche ergaben außerdem, daß die Diaminoxydase durch Streptomycin in einer Konzentration von 10^{-6} M gehemmt wird, ohne daß die Zellwand des das Enzym enthaltenden *M. smegmatis* verändert wurde. Auch Diguandin-Derivate, Abbauprodukte des Streptidins, waren noch wirksam. Diese Erscheinung führt man auf einen kompetitiven Effekt zurück, den man der Diguandinbindung zuschreibt. Unempfindlich ist die Diaminoxydase gegen Penicillin. Owen, Karlson und Zeller (46) konnten die Wirkung der Diaminoxydase bei *Staph. aureus* und *Ps. aeruginosa* durch Streptomycin, Dihydrostreptomycin, Streptothricin und Chloramphenicol herabsetzen.

Fitzgerald und Bernheim (18) fanden, daß Streptomycin die Tätigkeit der Benzoesäureoxydase von Mycobakterien hemmt. Das Streptomycin hemmt aber nicht die durch das bereits aufgebaute Enzym verursachte Oxydation, sondern die Bildung dieses Ferments.

Proteusbakterien, Klebsiellen und Salmonellen bilden aus Cystein, Cystin, Methionin und verschiedenen Sulfid-, Sulfat- und Thiosulfatverbindungen Schwefelwasserstoff (Olitzki, 45). Dieser Stoffwechselprozeß wird durch Penicillin bei Konzentrationen von 2 000 - 20 000 E/ml und Streptomycin bei 100 - 1 000 Gamma/ml blockiert (Bebrütungszeit 48 Stunden). Fermenthemmung und Antibiose laufen dabei nicht parallel. Bei Ruhekeimen trat durch die Antibiotika kein antibakterieller Effekt auf. Die Fähigkeit der H_2S -Bildung ging jedoch verloren, so daß eine Wirkung auf die Desulphydrasen angenommen werden kann.

Neben diesen Untersuchungen an einzelnen Enzymen sind auch zahlreiche über den Einfluß auf Fermentsysteme durchgeführt worden.

Als einfachstes Fermentsystem kann man wohl die adaptativen Enzyme bezeichnen, die dadurch entstehen, daß sich die Zelle veränderten Lebensbedingungen anpassen muß. Bernheim (5) untersuchte die adaptativen Fermente bei *Ps. aeruginosa*. Eine solche Bakterienkultur oxydiert die im Warburg'schen Apparat zugesetzte Benzoesäure nach 60 - 70 Min. In Gegenwart von Succinat tritt diese Oxydation wesentlich schneller ein. Ursache: beim Verbrauch von Succinat wird Energie frei, die zum Aufbau des adaptativen Enzymsystems verwandt wird. Zunächst verläuft die Fermentbildung proportional der zugesetzten Succinatmenge. Später ist sie jedoch stärker, da beim Abbau der Bernsteinsäure selbst Energie frei wird. Chlortetracyclin, Strepto-

mycin, Oxytetracyclin und Chloramphenicol hemmen die Fermentsynthese, später sogar das Enzym selbst.

Penicillin verhindert in ähnlicher Weise die Bildung der Guanosin-Oxydase, eines anderen adaptativen Enzyms, welches in Staphylokokken gebildet werden kann (Gros-Doucet und Gros, 24). Dieser Vorgang gibt zugleich einige Aufklärungen über den Wirkungsmechanismus des Antibiotikums. Es greift weder allgemein in die Proteinsynthese ein, noch hemmt es irgendwelche verwandte enzymatische Prozesse, sondern tritt stets an einem ganz bestimmten Punkt der Kette dazwischen. Dem Angriff der Fermentsynthese geht eine geringe vorübergehende Stimulierung voran. Der Effekt hängt von der Unversehrtheit des Penicillinmoleküls ab. Nach Zugabe von Penicillinase, welches die Lactam-Bindung des Penicillins aufhebt, ist der Vorgang reversibel. Man kann daher annehmen, daß die Hemmung von der Intaktheit dieser Bindung abhängt. Die SH-Gruppen scheinen in diesem Falle keine Rolle zu spielen (Florey und Mitarbeiter, 19).

Eines der wichtigsten Enzymsysteme ist das des Zitronensäure-Zyklus, dessen Beeinflussung durch Antibiotika von Green (22) untersucht wurde. Hier handelt es sich um ein sehr kompliziertes Fermentsystem, welches durch Antibiotika an zahlreichen Stellen unterbrochen werden kann. Zur Aktivierung des Zitronensäure-Zyklus ist Mg^{++} notwendig. Setzt man Chlor-tetracyclin zu, so wird dieses Mg als unlöslicher Komplex gebunden. Die Folge ist eine Hemmung der den Zitronensäure-Zyklus vorbereitenden Phosphorylierung (Van Meter und Mitarbeiter, 42).

Umbreit und Mitarbeiter (56, 58) untersuchten die Wirkung des Streptomycins auf den Zitronensäure-Zyklus. Dieses führt zu einer Hemmung der Kondensation zwischen Oxalessigsäure und Brenztraubensäure. Schädigt man die Permeabilität der Mitochondrien durch irgendeinen Eingriff (z. B. Eintauchen in nicht-isotonische Lösung), so kann man diesen Effekt auch bei Zellen höherer Organismen erzielen.

Van Potter und Reif (49) stellten fest, daß Antimycin das Succinoxidase-System der Leber hindert, die Umwandlung der D-Isozitronensäure in Oxalbernsteinsäure bzw. der Bernsteinsäure in Fumarsäure durchzuführen.

Voraussetzung für ein Funktionieren des Zitronensäure-Zyklus sind genügende Mengen Oxalessigsäure und Brenztraubensäure. Die Oxalessigsäure wird aus Asparaginsäure, Zitronensäure, Bernsteinsäure, Alpha-Keto-Glutarsäure gebildet. Quelle der Brenztraubensäure ist der Kohlehydratstoffwechsel.

Auch durch Beeinflussung der Bildung dieser Substanzen können die Antibiotika den Zitronensäure-Zyklus blockieren. So hemmt Dihydrostreptomycin in einer Coli-Kultur die Bildung der Brenztraubensäure dadurch, daß es den Abbau der Glucose verhindert (Barkulis, 3, 2).

Die hemmende Wirkung der Chlortetracycline auf andere Enzyme des Zitronensäure-Zyklus, z. B. der in E. coli auffindbaren Fumarsäurehydratase, Succinodehydratase und Äpfelsäuredehydratase zeigten Jacobsohn und Azevedo (28, 29) auf.

Die Bildung der Alpha-Keto-Glutarsäure aus der Glutaminsäure kann durch viele Antibiotika beeinflusst werden. Penicillin hemmt die durch die Nukleinsäuren katalysierte Synthese der Glutaminsäure (Gale und Folkes, 20).

Einfachere Enzymsysteme sind die Dehydrogenasesysteme. Best und Taylor (6) unterschieden folgende große Gruppen:

- 1) Wasserstoff wird durch die Flavoproteine auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei H_2O_2 entsteht. Dieses wird durch Katalase und Peroxydase zersetzt.
- 2) Wasserstoff wird durch Cytochrome bis zur Wasserbildung weiterbefördert.
- 3) Wasserstoff wird durch ein kompliziertes System (Codehydrogenasen, Flavoprotein, Cytochrom und Cytochromoxydase) mit Hilfe von Diphosphorpyridin- und Triphosphorpyridinnukleotid weiterbefördert.

Die Aktivität dieser Dehydrogenasen wird durch Tetracycline besonders gehemmt. In der Funktion der organischen Nitroreduktasen besteht die erste Phase der Reduktion aus der Übertragung des Wasserstoffs mittels einer spezifischen Dehydrogenase, Diphosphorpyridin-Nukleinsäure und evtl. eines Flavoproteins zu der Nitrogruppe, damit Nitrosederivat entstehen kann. Im Laufe des weiteren Vorgangs wird die reduzierte Diphosphorpyridin-Nukleinsäure oxydiert. Das Antibiotikum verhindert die Reduktion der Diphosphorpyridin-Nukleinsäure, ihre Reoxydation jedoch nicht (Saz und Slie, 54). Bei der weiteren Analyse dieses Mechanismus stellt sich folgendes heraus (Saz und Slie, 53): Zu der beschriebenen Reduktion sind Kationen (Mn^{++}) nötig. Chlortetracyclin bildet jedoch mit dem Mangan ein Chelat und entzieht es auf diese Weise dem Prozeß.

Zusammen mit der Cytochromoxydase bilden die Cytochrome A, B und C ein System, welches die Oxydation des durch die Dehydrogenasen aktivierten Wasserstoffs ermöglicht. In diesen Prozeß können die Antibiotika an zahlrei-

chen Stellen eingreifen. Es handelt sich dabei um wesentliche Vorgänge der Zellatmung. Manche Penicilline (C und V) hemmen im Warburg'schen Apparat die Zellatmung (Locker und Spitzzy, 36). Streptomycin und Dihydrostreptomycin vermindern nach anfänglicher Steigerung die Atmung aller drei Brucellentypen. Diese Wirkung ist jedoch mit der antibiotischen Aktivität nicht völlig identisch, da sie auch bei ruhenden Keimen beobachtet werden kann, ohne daß die Zellen dadurch in ihrer Lebensfähigkeit beeinflusst werden (McCullough und Beal, 40). Neomycin hemmt die Atmung der Staphylokokken- und Coli-Stämme nur während der Wachstumsphase (Camuri, 9).

Durch Aureomycin wird die Atmung von Leberhomogenaten innerhalb 10 Minuten eingestellt. Fügt man jedoch Citrat zu, so tritt die Hemmung erst nach 30 Min. ein (Van Meter und Oleson, 41). Vermutlich wirkt das Aureomycin hier durch Entziehung des Kations und gelangt während dieser Tätigkeit in Konkurrenz mit dem bekanntlich metallbindenden Citrat. Auch mit einer Suspension von Tierzellen (Kaninchen) kann man den hemmenden Einfluß des Aureomycins auf die Oxydation feststellen (Loomis, 37). Hier bindet es die Metallionen und interferiert nicht mit dem sauerstoffliefernden System. Terramycin beeinflusst die Atmung nur in Mengen, die im lebenden Organismus nicht erreicht werden (Crema und Baroli, 11).

Ein quantitativer Unterschied zeigt sich im Warburg'schen Apparat zwischen der Wirkung des Penicillins, Streptomycins, Terramycins und Dihydrostreptomycins auf die Atmung von Leberschnitten, je nachdem, ob diese in therapeutischen oder in höheren Konzentrationen angewendet werden. Die Verabreichung hoher Dosen schädigt auch die Zellen des Makroorganismus (Sawelsberg und Ströder, 52).

Den wichtigsten Beweis über den Einfluß der Antibiotika auf das Atmungssystem lieferten Versuche mit Albomycin (Gause, 21). Dieses aus *Aktinomyces subtropicus* hergestellte Antibiotikum enthält 4,16% Eisen und übt seine Wirkung auf Staphylokokken, sowie auch auf *E. coli* ausschließlich in Gegenwart von Sauerstoff aus. Es interferiert mit dem eisenhaltigen Atmungsferment der Bakterien. In diesem Falle sind die Wirkung auf das Atmungssystem und der antibiotische Effekt identisch.

Zum Schluß soll noch einmal besonders auf den Wirkungsmechanismus des Penicillins eingegangen werden. Generell kann gesagt werden, daß sich die bekannten Penicilline in dieser Hinsicht nicht unterscheiden.

Mosonyi (44) stellt fest, daß bei Untersuchungen mit Staphylokokken am meisten die Nukleinsäuresynthese von dem in die Zelle eingedrungenen Antibiotikum betroffen wird. In erster Linie wird der Stoffwechsel der Ribonukleinsäure gestört. Durch das Antibiotikum kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Nukleinsäure, Nukleotid und Protein, so daß weniger Nukleinsäure und mehr Nukleotide entstehen. Auch Machéboeuf konnte diese Hemmung des Nukleotidabbaus feststellen. Folge der Hemmung der Nukleinsäuresynthese ist ein Ausbleiben der damit verbundenen Proteinsynthese. Verantwortlich für diesen Effekt soll die SH-Gruppe sein. Bei Bakterien, die sich in der Teilungsphase befinden, wirkt Penicillin hemmend auf die Aktivität der Peptidase. Ruhende und wachsende Keime unterscheiden sich in der Empfindlichkeit der Enzyme gegen Antibiotika. Der durch Staphylokokken verursachte Abbau der Guanylsäure wird durch Penicillin in einer Konzentration von 2 000 - 3 000 E/ml verhindert; bei in der Wachstumsphase befindlichen Keimen war jedoch nur eine Konzentration von 3 - 10 E/ml notwendig (Gros und Mitarbeiter, 23).

Die Bildung des aus Cystein und Glycin entstehenden Cysteinglycins wird durch das Penicillin ebenfalls gehemmt. Ebenso wird die Rolle des Glutathions in der Transpeptidation beeinflusst. Man faßt hier das Penicillin als stereochemisches Analogon des Glutathions auf, mit der Dimethylcysteinwurzel an Stelle des Glutaminanteils. Das Penicillin steht daher in Konkurrenz mit dem Glutathion. Seine Wirkung wird aus dem gleichen Grunde durch das strukturell verwandte Cystein aufgehoben.

Mosonyi (2) konnte in vitro feststellen, daß sich durch die Einwirkung von Antibiotika der Glutathiongehalt in *Str. haemolyticus*-, *Staph. aureus*- und *E. coli*-Kulturen anfänglich erhöht. Nach Mosonyi stammt die Vermehrung teilweise aus dem Abbau des Penicillins, teilweise aus der Anhäufung der pathologischen Aminosäure (Glutaminsäure), welche infolge des auf die autokatalytische Weise gestörten Stoffwechsels der Bakterien zustande kommt.

Endphase der bakteriellen Wirkung des Penicillins ist die Bakteriolyse. Hier steht das Na-Ribonukleat in Antagonismus mit dem Penicillin. Fluorid und Natriumcyanid hemmen die bakteriolytische Wirkung des Penicillins, beeinflussen jedoch nicht die Bakterizidie. Es zeigt sich also, daß die Lyse Endergebnis eines autokatalytischen Vorgangs ist, der mit dem Stoffwechsel der Ribonukleinsäure in Zusammenhang steht und zur Antibiose keine Beziehungen hat.

Mosonyi faßt die Wirkung des Penicillins auf Bakterienzellen folgendermaßen zusammen:

- 1) Das Antibiotikum setzt die Volumenzunahme der Zellen durch Verminderung der Teilungsfähigkeit in Gang.
- 2) Dadurch verändert sich das Verhältnis der Oberfläche zum Volumen, die Assimilationsvorgänge der Zellen werden herabgesetzt und die Widerstandsfähigkeit geschwächt. In erster Linie erfolgt eine Hemmung der Assimilation der Glutaminsäure.
- 3) Es häufen sich stickstoffhaltige Stoffe ohne Aminogruppen und Glutathion an und das Verhältnis zwischen Ribonukleinsäure und Desoxyribonukleinsäure, welches von entscheidender Bedeutung ist, vermindert sich.
- 4) Die Proteinsynthese wird unterbunden und in der Zelle häufen sich toxische Polypeptide an.
- 5) Die Zellen lösen sich infolge Autokatalyse auf.

Neben der Fähigkeit des Penicillins, die Funktion der Fermente zu beeinflussen, ist es auch noch in der Lage, die Bildung von Enzymen, die man als adaptative Enzyme (s.o.) bezeichnet, zu bewirken. Pollock und Perret (47, 48) untersuchten die durch Penicillin hervorgerufene Bildung der Penicillinase bei *Bac. cereus*. Sie fanden, daß selbst ein kurzer Kontakt (über 1 Min.) zwischen *Bac. cereus* und dem Induktor genügt, um die Synthese der Penicillinase auszulösen. Hält man während des kurzen Kontaktes die Versuchsbedingungen so, daß weder Wachstum noch Proteinsynthese möglich sind (Temp. 0° , ohne Energiequelle), so kann man, wenn man die Erreger anschließend auf einen penicillin-freien Nährboden überträgt, trotzdem nach geringer Latenzzeit die Bildung des Fermentes beobachten. Dazu sind jedoch Sauerstoff und bestimmte Nährsubstanzen notwendig. Während der Inkubationszeit ist von den Zellen Penicillin irreversibel aufgenommen worden und zwar a) durch Bindung an einen Rezeptor mit hoher Affinität, der bereits bei einer Konzentration von 1 E Pc/ml gesättigt ist, b) durch andere Wege, auf denen ein der Konzentration proportionaler Betrag fixiert wird. Kogut, Pollock und Tridgell (32) konnten feststellen, daß das Maximum des aufgenommenen Betrags bei 100 Molekülen pro Zelle liegt, und daß 1 Molekül Penicillin die Bildung von 30 Molekülen Penicillinase verursacht.

Über die Wirkung, die das Penicillin auf die Zellen des Makroorganismus ausübt, ist bisher wenig bekannt. Hohe Dosen bewirken eine Verminderung der Aktivität der Phagocyten. Sehr hohe Konzentrationen heben die Phago-

cytose auf. Gibt man mit dem Antibiotikum Kobalt, so kann man eine Steigerung der Phagocytose beobachten (Lambin und Devignes, 33). Durch Gabe von Vitaminen kann man in vivo diese phagocytosemindernde Wirkung des Antibiotikums mildern. Es handelt sich also um eine reversible Enzymhemmung.

Eger (17) fand bei Untersuchungen der Beeinflussung von Lebernekrosen durch Penicillin, daß diese Nekrosen, die er durch Allylalkoholgabe ausgelöst hat, nach Zusatz von Penicillin weitgehend eingeschränkt werden. Er nimmt als Ursache eine Wirkung des Penicillins auf die Blutgewebsschranke und Zellgrenzfläche an. Auch Blaich (7) sah nach Penicillineinfluß eine Permeabilitätsänderung an Hautcapillaren, die in diesem Falle jedoch in einer Erhöhung der Durchlässigkeit bestand, während Eger eine Verminderung annahm. Nach Blaich kann man den Befund an den Hautcapillaren nicht ohne weiteres auf andere Organe übertragen. Jedenfalls konnten beide einen Einfluß auf die Grenzfläche feststellen. Außer der Wirkung auf die Permeabilität nimmt Eger noch einen stabilisierenden Effekt auf die Fermentssysteme der Zelle an. Ebel, Vendrely und Tulasne (16) schlossen aus ihren Untersuchungen über die Wirkung des Penicillins auf den Phosphor- und Stickstoffwechsel bei *Proteus vulgaris* auf eine Änderung der Permeabilität, die aber in diesem Falle die Keime selbst betrifft. Sie nehmen eine vermehrte Durchlässigkeit an. Markowitz, Rappaport und Scott (39) setzten bei Hunden Lebernekrosen durch Unterbindung der Arterie und stellten fest, daß nach Penicillingabe weniger Nekrosen auftreten. Sie nehmen mit Dragstadt und Mitarbeiter (14) an, daß die in der Leber vorhandenen Anaerobier zu wachsen beginnen, wenn die Arterie unterbunden ist, also der Sauerstoffgehalt des Blutes vermindert wird.

MATERIAL UND METHODEN

Als Nährboden wurde bei den vorliegenden Untersuchungen eine Bouillon verwendet, die aus physiologischer Kochsalzlösung und Pepton aus Casein "Merck" bestand. Die Peptonkonzentration betrug 2%.

Chemische Nachweismethoden:

- 1) Der qualitative Ammoniaknachweis erfolgte nach der Methode von Hansen (25):

Es werden zwei Testlösungen angesetzt:

Lösung A: 2g Thymol, 10 ml 2n NaOH und 90 ml Aqua dest.

Lösung B: 100 ml gesättigtes Bromwasser, 3,5 ml 2n NaOH

5 ml der neutralen oder mit verd. Natriumbikarbonatlösung schwach alkalisch gemachten Bouillon werden nach 24 Std. bei 37° C durchgeführter Bebrütung mit je 1 ml der Lösungen A und B versetzt. Nach etwa 10 - 15 Min. entsteht ein grünlich-blauer Farbumschlag, der auf eine Ammoniakentwicklung hindeutet. Setzt man unter kräftigem Schütteln 0,5 ml Äther zu, so tritt - wenn Ammoniak vorhanden ist - eine Rotfärbung der oben schwimmenden Ätherschicht auf.

- 2) Die qualitative Bestimmung des Schwefelwasserstoffs wurde mit einem Bleiacetatpapierstreifen durchgeführt. Hier tritt durch die Bildung von Bleisulfid eine braunschwarze Farbe auf.
- 3) Quantitativer Ammoniaknachweis: Da die zu erwartenden Ammoniakmengen nur sehr gering sein konnten, war hier nur eine Methode brauchbar, die auf kleinste Mengen reagierte und zugleich noch eine quantitative Auswertung zuließ. Der Nachweis mit Nessler's Reagens schien für diesen Zweck sehr geeignet. Das Reagens enthält Kaliummercurijodid ($K_2(HgJ_4)$), welches mit Ammoniak unter Bildung von Oxyquecksilberammoniumjodid ($(OHg_2NH_2)J$) reagiert. Dabei entsteht ein orange-gelber Niederschlag. Hält man jedoch das Oxyquecksilberammoniumjodid kolloidal gelöst, so kann man aus der gelbgefärbten Lösung die Ammoniakmenge photometrisch bestimmen. Die kolloidale Lösung erreicht man, indem man Nessler's Reagens im Überschuß über die zu erwartende Ammoniakmenge vorlegt.

Das Ammoniak wurde mit Hilfe von CO_2 in eine aus Nessler's Reagens bestehende Vorlage übergeleitet. Es trat eine Gelbfärbung der Lösung ein. Eine photometrische Bestimmung war jedoch nicht möglich, da sich die Lösung getrübt hatte. Eine Prüfung des pH-Wertes zeigte, daß sich dieser von pH 12 auf pH 7 verschoben hatte. Als Ursache wurde die Bildung von Kohlensäure H_2CO_3 angenommen, die durch das zugeleitete CO_2 bewirkt wird, und ein Zusammenhang zwischen der pH-Änderung und der Trübung vermutet. Bei einer Wiederholung des Versuches erfolgte daher die Überleitung des Ammoniaks mit Stickstoff. Der pH-Wert blieb diesmal konstant. Die Trübung des Reagens konnte aber nicht verhindert werden. Der Verdacht, daß die zum Überführen des Ammoniaks verwandten Gase irgendwelche Verunreinigungen enthalten könnten und dadurch eine Trübung der Lösung bewirkt würde, ließ sich nicht bestätigen, denn ein Durchströmen des Reagens ohne Vorschaltung der Keimlösung ergab keine Trübung.

Nachdem der Versuch über 24 Std. ausgeführt worden war, konnte festgestellt werden, daß die getrübbte Lösung stark nach Sulfiden roch. Beim Stoffwechsel der Bakterien entsteht nun neben Ammoniak auch noch Schwefelwasserstoff. Dieser konnte mit den im Nessler'schen Reagens vorhandenen Hg^{++} -Ionen Quecksilbersulfid HgS bilden, wodurch ein grauer Niederschlag entsteht. War diese Annahme richtig, so mußte folgende Versuchsanordnung die Trübung verhindern: Die gasförmigen Stoffwechselprodukte werden in Schwefelsäure geleitet. Die Schwefelsäurelösung verdrängt den Schwefelwasserstoff. Eventuell zurückgebliebener Schwefelwasserstoff wird durch Zusatz von 30% Wasserstoffperoxyd hochoxydiert und in Schwefelsäure umgewandelt. Das Ammoniak bildet mit den SO_4 -Ionen Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Durch Zusatz von 35% NaOH wird das Ammoniak aus der Lösung freigesetzt und in eine Vorlage aus Nessler's Reagens übergeleitet. Trotz dieser Vorsichtsmaßnahmen trat eine Trübung ein, so daß eine photometrische Bestimmung nicht möglich war.

Wegen der Erfolglosigkeit dieser Methode wurde nun versucht, die quantitative Analyse titrimetrisch durchzuführen. Das von den Bakterien gebildete Ammoniak wird mit einer Wasserstrahlpumpe in eine Vorlage einer stark verdünnten Schwefelsäure übergeführt, ähnlich wie bei der Methode der Harnstoffbestimmung durch das Ferment Urease. Um dabei den Schwefelwasserstoff der Luft auszuschalten, wird eine Waschflasche mit konzentrierter Schwefelsäure vorgeschaltet. Der nicht zur Ammoniumsulfatbildung verbrauchte Teil der Schwefelsäure wird jodometrisch bestimmt. Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse schwankten jedoch so stark, daß eine Verwendung dieser Methode nicht möglich war. Ein Versuch der Bestimmung mit der Kjeldahlapparatur liefert ebenfalls nur unbrauchbare Werte.

Eine von E. J. Conway und A. Byrne (10) beschriebene Methode liefert bei der Probe exakte Ergebnisse und konnte für die vorliegenden Nachweise verwandt werden. Die quantitative Stickstoffanalyse erfolgt hier in den sog. Conway-Kammern. In der Mitte des Bodens dieser Bestimmungsapparaturen befindet sich eine runde Kammer, die zirkulär von einer zweiten Kammer umgeben ist. Beide sind durch einen ringförmigen Glaswall voneinander getrennt. In die mittlere Kammer füllt man 1 ml 1% Borsäure und gibt dazu 2 Tropfen Tashiro-Indikator. In die äußere Kammer pipettiert man 2,5 ml der Bouillon, aus der das erhaltene Ammoniak bestimmt werden soll. Durch Zugabe von 5 ml einer 33% NaOH setzt man das Ammoniak dieser Lösung frei. Man verschließt

nun die Kammer mit einem Schliffstopfen und läßt sie 24 Std. bei einer Temperatur von 37°C stehen. Das freigesetzte Ammoniak wird in dieser Zeit von der Borsäure absorbiert und kann dann durch Titration mit Schwefelsäure quantitativ bestimmt werden.

- 4) Quantitative Schwefelwasserstoffbestimmung: Zunächst wurde versucht, die entstandene Schwefelwasserstoffmenge durch Bildung von Methylenblau und anschließender Photometrie zu bestimmen. Dabei reagiert der Schwefelwasserstoff mit p-Aminodimethylanilin in Gegenwart einer oxydierenden Substanz. Als Endprodukt dieser Reaktion entsteht das Methylenblau. Die Arbeitsmethode war jedoch sehr umständlich und lieferte nur ungenaue Ergebnisse.

Bessere Werte erhielt man mit einer von W. Geilmann und G. Tölg (21 a) entwickelten Methode. Der Schwefelwasserstoff wird mittels Stickstoff in 2n NaOH übergeleitet. Es entsteht Natriumsulfid. Die quantitative Sulfidbestimmung erfolgt anschließend mit einer Cadmiumlösung, wobei Dithizon als Indikator dient.

Spezielles zur Ammoniakbestimmung: In dem hier vorliegenden Fall wurde das nach einer bestimmten Bebrütungszeit in der Keimlösung enthaltene Ammoniak durch eine stärkere Lauge verdrängt und von einer 1% Borsäure absorbiert. Die absorbierte Ammoniakmenge kann man anschließend durch Titration mit Schwefelsäure quantitativ bestimmen. Mit dieser Methode lassen sich Ammoniakmengen von weniger als 0,01 mg quantitativ erfassen. Der Bestimmungsfehler liegt bei 0,5%.

Reagentien: Als Absorptionsmittel wurde Borsäure verwandt. Um in dieser Säure vorhandene Kohlensäure, die ja das Titrationsergebnis beeinflussen würde, zu entfernen, wurde die Borsäure vor Versuchsbeginn 5 Minuten lang gekocht.

Indikator war Tashiro-Indikator, der in saurem Milieu rosarot, in alkalischem Milieu grün gefärbt ist. In neutraler Lösung ist der Indikator farblos.

Als stärkere Lauge zum Verdrängen des in der Keimlösung enthaltenen Ammoniaks wurde 33% Natronlauge benutzt.

Die Titration erfolgte mit Schwefelsäure. Die Normalität der Säure muß entsprechend der zu erwartenden Ammoniakmenge gewählt werden. Sie darf nicht zu niedrig sein, damit die zur Neutralisation notwendige Menge das Fassungsvermögen der mittleren Kammer der Conway-Apparatur, in der die Titration erfolgen muß, nicht überschreitet.

Ausführung: In die mittlere Kammer der Conway-Apparatur füllt man mit einer Vollpipette 1 ml 1% Borsäure und gibt dazu 2 Tropfen Tashiro-Indikator. Die Lösung soll farblos sein. Tritt nach Zugabe des Indikators eine

rote oder grüne Farbe auf, so ist die Lösung durch Säure- oder Alkalibestandteile verunreinigt. Häufig handelt es sich dabei um von der Borsäure aus der Luft absorbierte Kohlensäure, die man durch Kochen der Säure (s. o.) entfernen kann. Gelingt dies nicht, so muß die Borsäure neu hergestellt werden. In manchen Fällen handelt es sich um Verunreinigungen der Conway-Kammern, die dann gereinigt werden müssen.

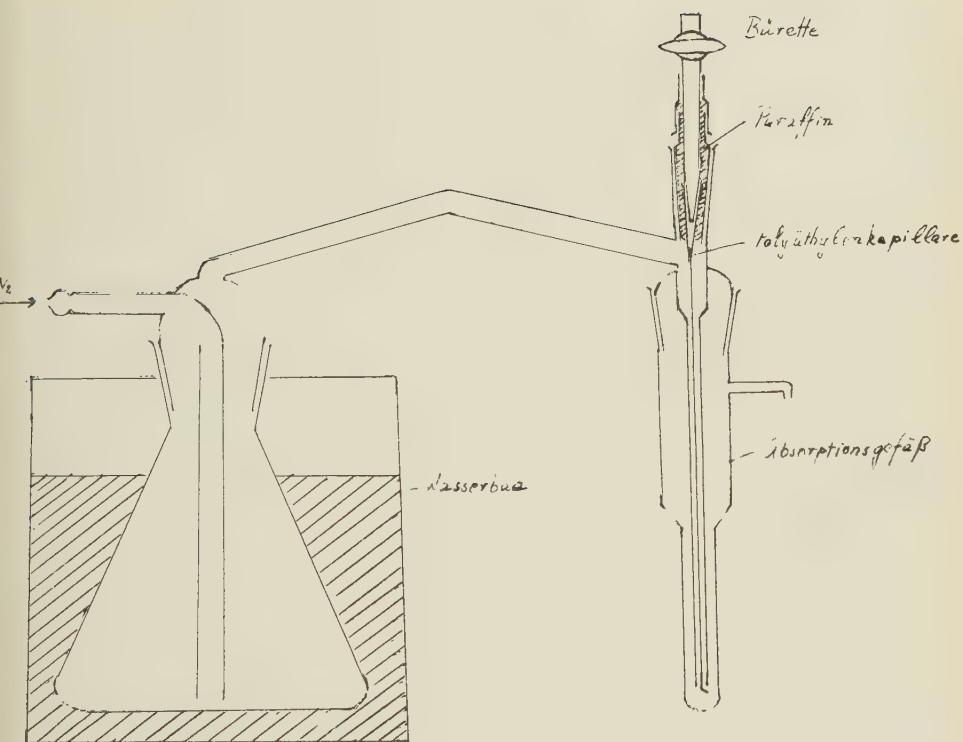
In die äußere Kammer füllt man mit einer Vollpipette 2,5 ml der Keimlösung und gibt dazu 5 ml 33% NaOH. Man verschließt nun die Apparatur mit einem Schliffstopfen, den man zuvor mit Glycerin eingefettet hat. Durch mehrmaliges Drehen der Conway-Kammer erreicht man eine innige Durchmischung der Keimlösung und der Natronlauge. Die Kammer wird nun in einem Brutraum bei einer Temperatur von 37°C 24 Stunden lang stehen lassen. Nach dieser Zeit öffnet man die Kammer und titriert. Damit man eine gute Durchmischung der Schwefelsäure mit der zu titrierenden Lösung erhält, schaltet man bei der Titration einen Magnetrührer ein.

Nach Beendigung des Versuchs muß die Kammer mit Aqua dest. mehrmals gründlich gereinigt werden.

Spezielles zur Schwefelwasserstoffbestimmung: Damit eine quantitative Analyse des von den Bakterien gebildeten Schwefelwasserstoffs erfolgen konnte, wurde das Gas von einer 2n NaOH absorbiert. Es entsteht Natriumsulfid, welches unter Abschluß von Sauerstoff völlig beständig ist, so daß es maßanalytisch erfaßt werden kann. Wegen der Unbeständigkeit des Natriumsulfids bei Gegenwart von Sauerstoff mußten die Versuche jedoch unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden.

In der nebenstehenden Abbildung ist die Bestimmungsapparatur dargestellt (Geilmann und Tölgl).

Die Bebrütung der Keime erfolgte in einem Erlenmeyerkolben, der sich in einem Wasserbad bei einer Temperatur von $37 - 38^{\circ}$ befindet. Dieser Kolben ist mit einem Glasschliff verschlossen, in den ein Ansatz zum Eintritt des Treibgases (Stickstoff) sowie ein Überleitungsrohr eingeschmolzen sind. Das Überleitungsrohr ist mit einem Einleitungsrohr, welches in die Vorlage führt, verbunden. Dieses Einleitungsrohr reicht bis kurz über den Boden des Absorptionsgefäßes. In den Schliff am oberen Ende des Einleitungsrohres wird die zur Titration erforderliche Hahnmikrobürette von 2 ml mit 0,005 ml Teilung in folgender Weise eingesetzt: Auf die Auslaufspitze der Bürette wird mittels Gummischlauch der zum Schliff des Einleitungsrohres gehörende Kern gesetzt. Zur Vermeidung eines Totraums wird der zwischen Büettenlaufrohr und Schliff entstandene Hohlraum mit Paraffin ausgegossen. Über die vorragende Büetten-



mg N_2

0.88 l

gebildetes Ammoniak in mg N_2 /ml

100

0.50

Gesamtstickstoff der Gokkerei in mg N_2 /ml

Kerne ohne R

Kerne + 1 E R /ml

Kerne + 10 E R /ml

Kerne + 20 E R /ml

2 4 5

10

20

24

2

mg N / mg Bakter-N

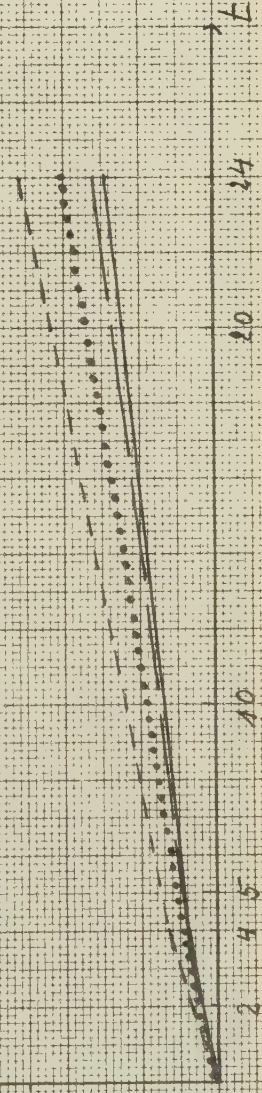
Abb. 2

— Kerne ohne P
— Kerne + 15 P / ml
..... Kerne + 10 E P / ml
— Kerne + 20 E P / ml

gebildetes Ammoniak in mg N₃ bezogen auf

mg Gesamtkohlenstoff

5.00



mg/l

0.88 3

geklärtes Wasser in mg N/l

0.50 Gesamtstickstoff der Bakterien in mg N/l

400

— Keime ohne Fe

-- Keime + 1 Fe/l

... Keime + 10 Fe/l

2 4 5

10

20

24

28

mg N_2 / mg Bak. - N

Abb. 4

— Keime ohne P_0

- - - Keime + 1 EP / ml

... Keime + 10 EP / ml

gel. festes Ammoniak im mg N_2 bezogen auf

1 mg Gesamtstickstoff

5.00

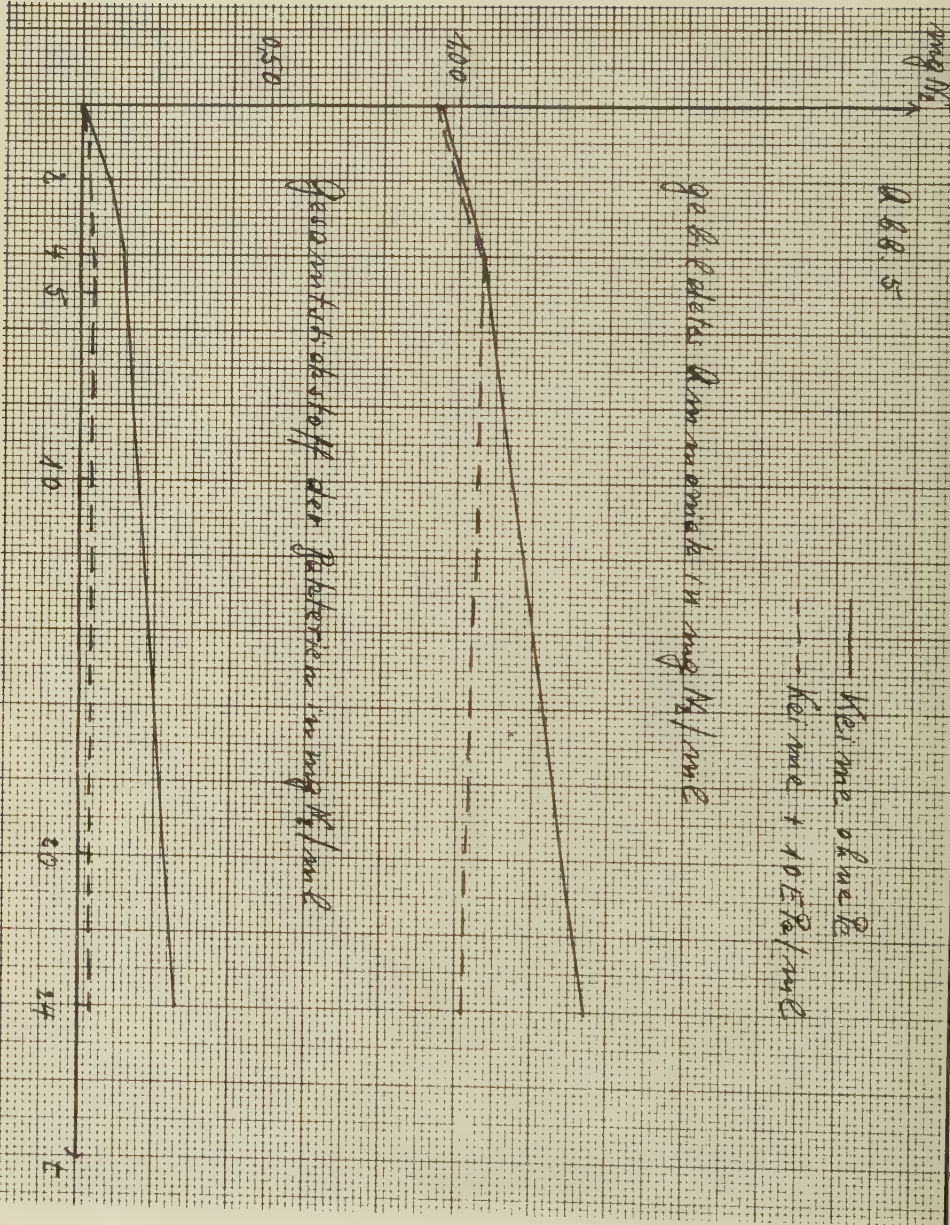


Q 88.5

— Kerne ohne P
--- Kerne + 10 ER/mL

gefiltes Kammern in mg H_2 /mL

Gesamtstoff der Polymeren in mg H_2 /mL

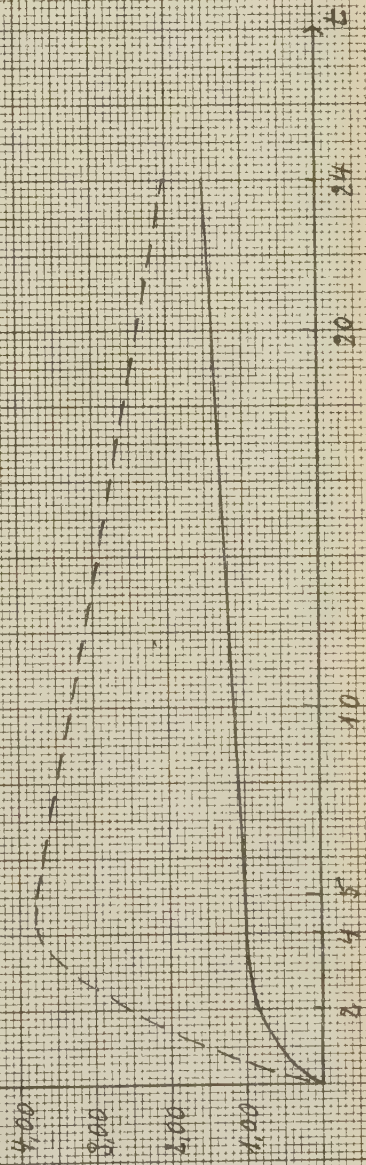


mg N_2 lang Zeit - II

Abb. 6

— Keime ohne P_2
-- Keime + 10 E P_2 /ml

gebildetes Ammoniak in mg N_2 bezogen auf
mg Gesamtschwebstoff



mg N_2

0.887

Keime ohne R_0

-- Keime + 1 ER/mL

4.00

gebildet am 20.12.1912 in mg N_2 /mL

0.50

Gesamtstickstoff der Bakterien in mg N_2 /mL

2 4 5

10

20

24

27

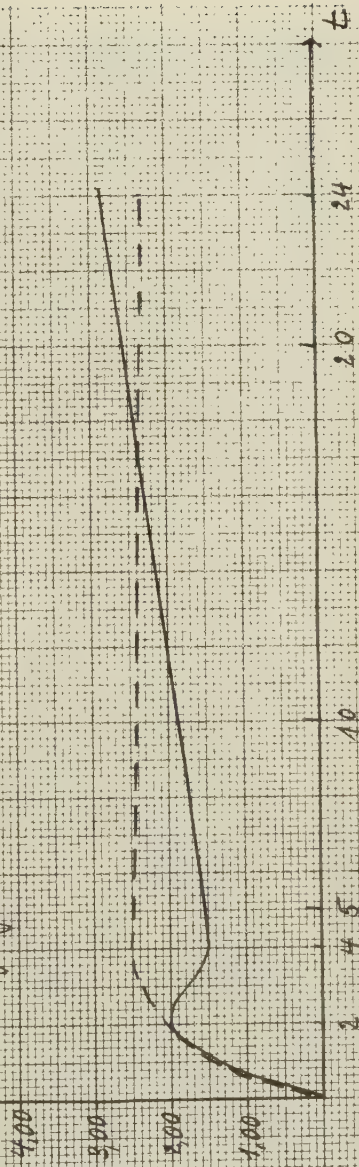
mg N_2 / mg Rohf. N

Abb. 8

— Keime ohne P
- - - Keime + 1% Rohf.

geb. Lakt. Ammoniak in mg N_2 bezogen auf

mg Gesamtstickstoff



mg N_2

288.9

— Kerne ohne R
- - Kerne + fE R/one

geplantes Ammoniak in mg N_2 /mL

400

0.50

Gesamtstickstoff der Bakterien in mg N_2 /mL

2 4 5

10

20

24

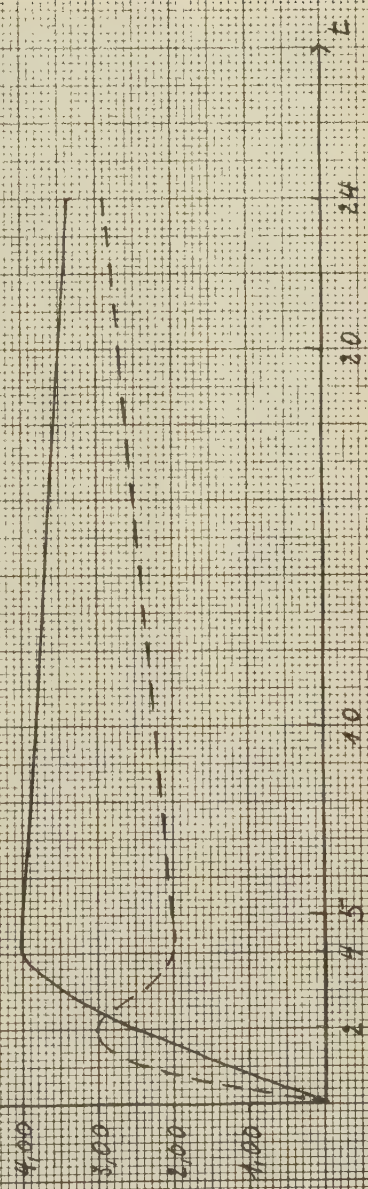
h

mg N_2 / mg Bakt. M

Abb. 10

— Keime ohne L
- - Keime + 15 μ l/ml L

gebildetes Ammoniak in mg N_2 bezogen auf
1 mg Gesamtschwebstoff



mg N_2

200 h

gebildetes Ammoniak in mg N_2 /ml

— keine ohne B

— Kerne + 500 E β /ml

... Kerne + 1000 E β /ml

1,00

0,50

Gesamtstickstoff der Bakterien in mg N_2 /ml

2 4 5

10

20

24

t

mg N_2 / mg
Bakt. - N

0.88 12

— Keime ohne P_2

-- Keime + 500 ER/m ℓ

..... Keime + 1000 ER/m ℓ

gebildetes Ammoniak in mg N_2 bezogen auf

1 mg Gesamtstickstoff

5,00



mg N₂

Aug 13

keine ohne R

— keime + 5000 B/ml

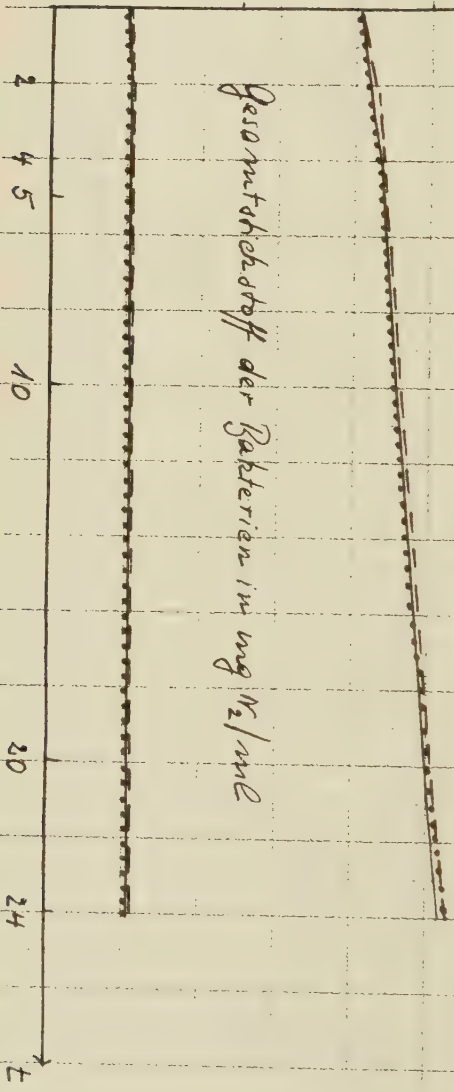
.... keime + 10000 B/ml

gefiltes Ammoniak in mg N₂/ml

1,00

0,50

Gesamtstickstoff der Bakterien in mg N₂/ml



mg N₂ / mg Bakt.-N

Abb. 14

- Keime ohne P₂
- - - Keime + 500 EP/ml
- Keime + 1000 EP/ml

gebildetes Ammoniak in mg N₂ bezogen auf

1 mg Gesamtstickstoff

5,00 -



mg N_2

0.88. 15

— keine ohne P

— keine + 1000 E P /ml

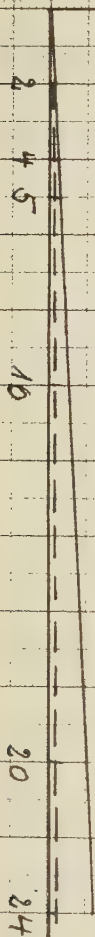
gebildetes Ammoniak in mg N_2 /ml

100



0.50

Gesamtstickstoff der Bakterien in mg N_2 /ml



mg N_2 / mg Bakt. M

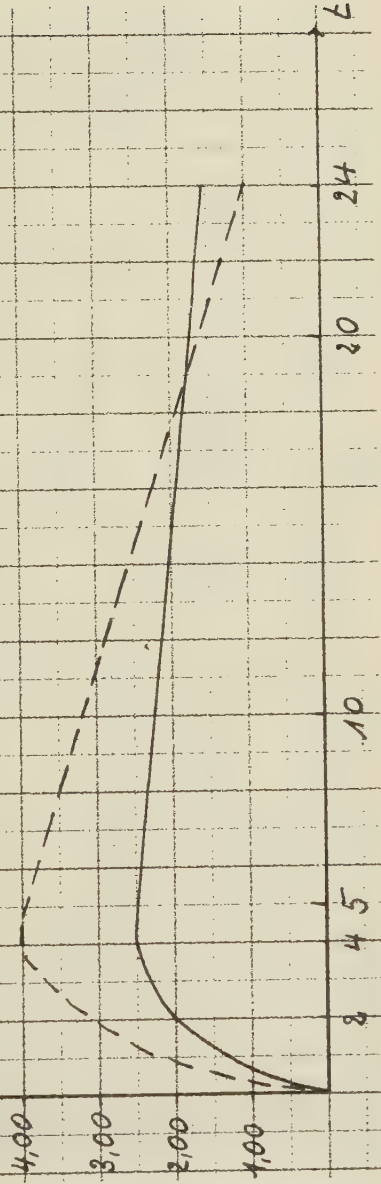
Abb. 16

— Keime ohne N_2

-- Keime + 1000 E B_{10} /ml

gebildetes Ammoniak in mg N_2 bezogen auf

1 mg Gesamtstickstoff



mg N_2

0.8.17

Keime ohne N_2

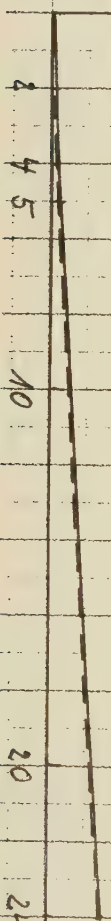
--- Keime + 500 $\frac{g}{m^2}$

geb. Leetes Wachstum in mg N_2/m^2

4.00

0.50

Gesamtstickstoff der Bakterien in mg N_2/m^2



t

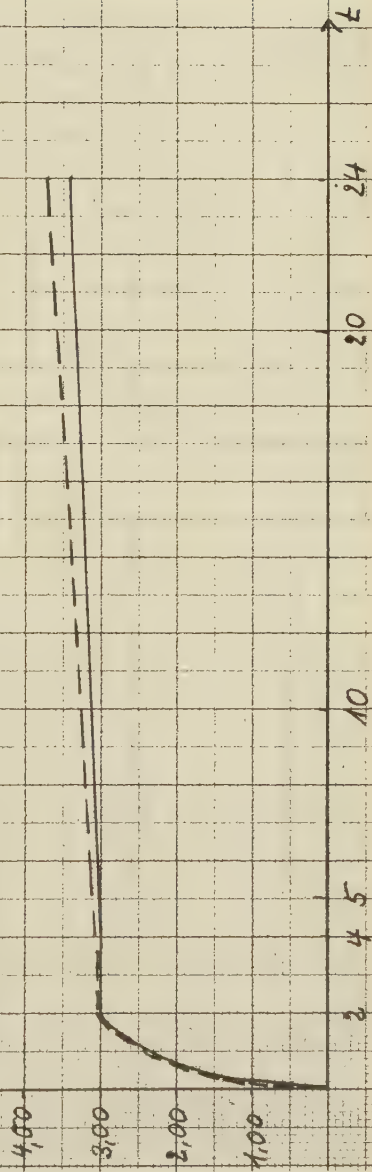
mg N_2 / mg Bakt. - N

Abb 18

— Keime ohne N_2

-- Keime + 500 ER/m²

gebildetes Ammoniak in mg N_2 bezogen auf
1 mg Gesamtnährstoff



mg N₂

0.88.19

— Keime ohne E

-- Keime + 500 EE/mE

gebildetes Ammoniak in mg N₂/mE

100



0.50

Gesamtstickstoff der Bakterien in mg N₂/mE



2 4 5

10

20

24

h

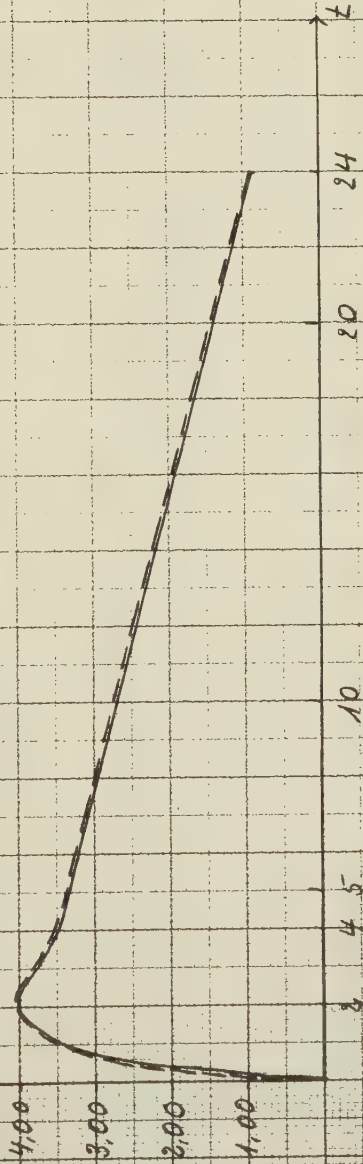
mg N_2 / mg Kakt. - N

Abb. 20

— Keime ohne P_2
--- Keime + 500 ER/ml

gebildetes Ammoniak in mg N_2 bezogen auf

1 mg Gesamtschwebstoff



28821

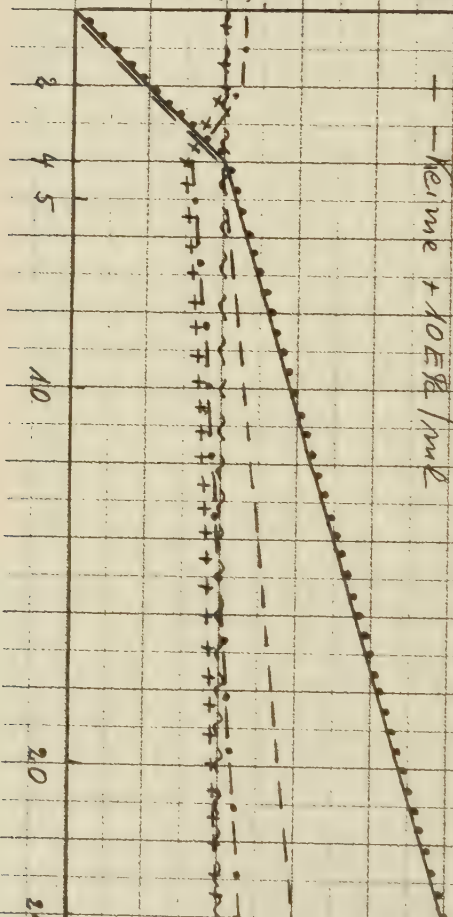
a) gebildeter Schwefelwasserstoff in $\mu\text{g S/l ml}$

- Kerne ohne K
- - Kerne + 1 ER/ml
- ... Kerne + 10 ER/ml

b) Gesamthickstoff der Batterien in $\mu\text{g N}_2/\text{ml}$

- ~ Kerne ohne K
- + + Kerne + 1 ER/ml
- - Kerne + 10 ER/ml

c) $\mu\text{g N}_2$



$\mu\text{g S} / \text{mg Bakt. N}$

Abb. 22

- Keime ohne P_2
- - Keime + $1 \text{ EP} / \text{ml}$
- Keime + $10 \text{ EP} / \text{ml}$

gebildeter Schwefelwasserstoff in $\mu\text{g S}$
bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

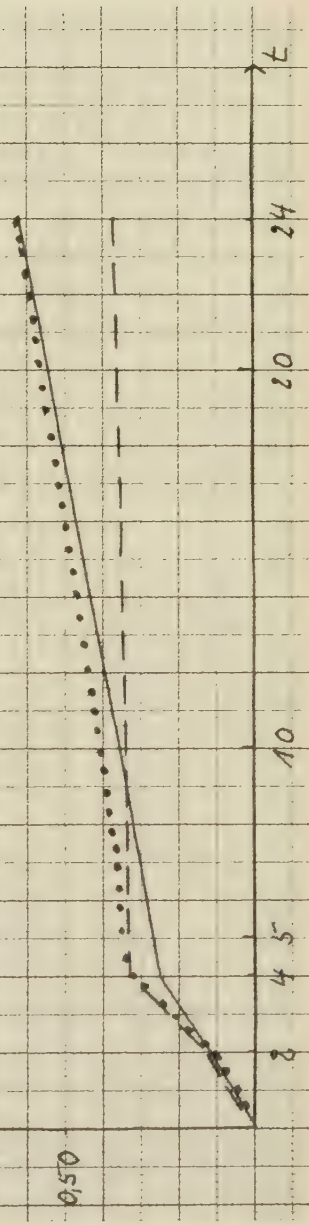


Abb. 23

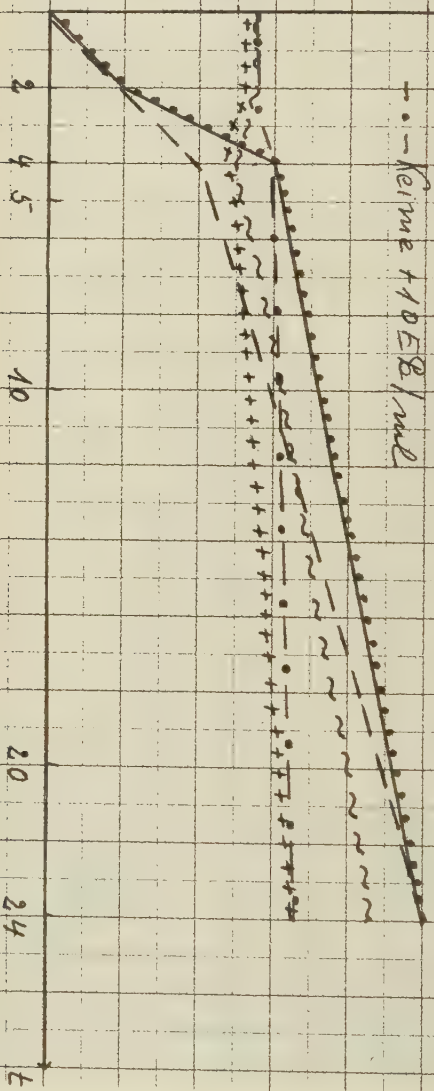
abgebildeter Schwefelwasserstoff in $\mu\text{gS}/\text{ml}$

- Keime ohne R
- — Keime + 1 E.R./ml
- ... Keime + 10 E.R./ml

6) Gesamtschwefelstoff der Bakterien in $\mu\text{gS}_2/\text{ml}$

- ~ Keime ohne R
- +++ Keime + 1 E.R./ml
- - - Keime + 10 E.R./ml

8) μgS_2

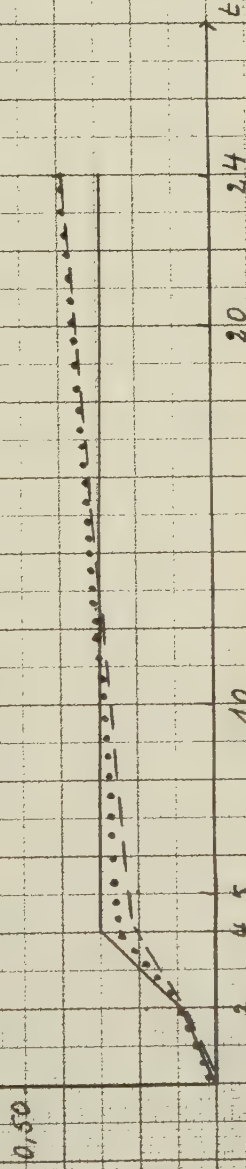


$\mu\text{g S} / \text{mg Bakt-N}$

2.8.8.24

- Keime ohne P_2
- - Keime + 1 E P_2 / ml
- Keime + 10 E P_2 / ml

gebildeter Schwefelwasserstoff in $\mu\text{g S}$
bezogen auf 1 mg Gesamtschwebstoff



0.86 2.5

a) gel. Bauteil Sehwefelwasserstoff in mg S/mL

— — — — — Keime ohne R_0

- - - - - Keime + 1 E R_0 /mL

· · · · · Keime + 10 E R_0 /mL

b) Gesamtschwefelstoff der Bakterien in mg H_2S /mL

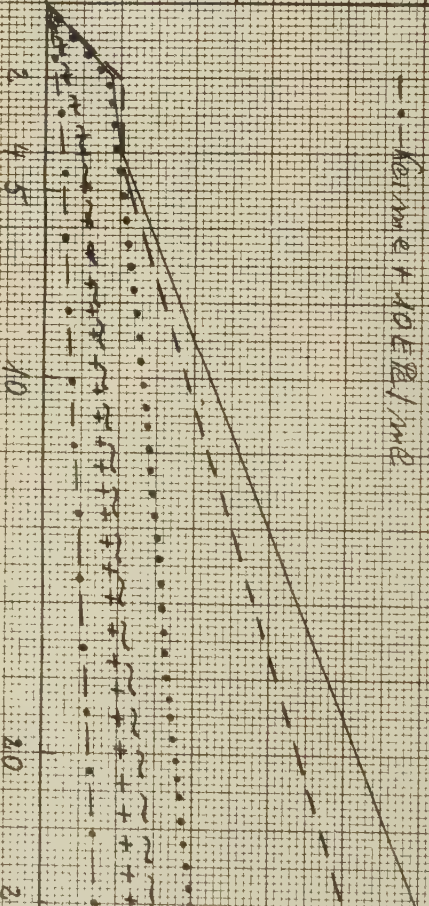
— — — — — Keime ohne R_0

+ + + + + Keime + 1 E R_0 /mL

- - - - - Keime + 10 E R_0 /mL

a) 0.05
mg S

a) 0.10
mg S



mg S/mg Bakt. M

Abb. 26

— Kerne ohne P.
— Kerne + 15 P./ml
... Kerne + 10 E.B./ml

gebildeter Schwefelwasserstoff in mg
bezogen auf 1 mg Gesamtschwefelstoff

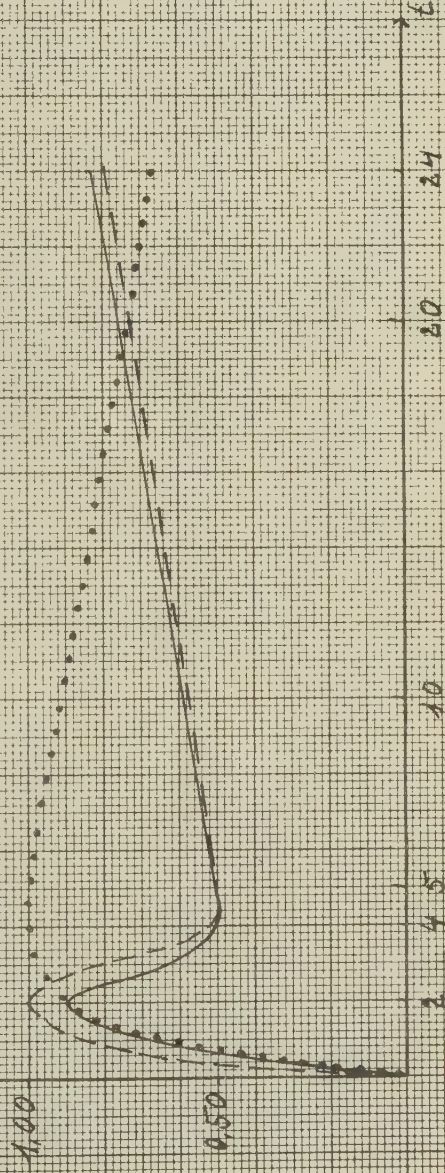


Abb 24

a) gebildeter Schwefelwasserstoff in mg S/m^3

— Kerne ohne R

— Kerne + 500 $\pm$ R/mL

••• Kerne + 1000 $\pm$ R/mL

b) Gesamtschwefelstoff der Bakterien in mg N/m^3

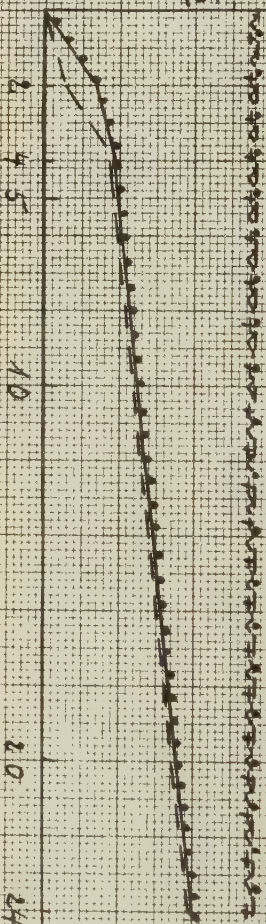
— Kerne ohne R

+ Kerne + 500 $\pm$ R/mL

— Kerne + 1000 $\pm$ R/mL

a) $\left\{ \begin{array}{l} 0,05 \\ \text{L/mg S} \end{array} \right.$

b) $\left\{ \begin{array}{l} 0,10 \\ \text{L/mg N} \end{array} \right.$



mg/kg Pekt. IV

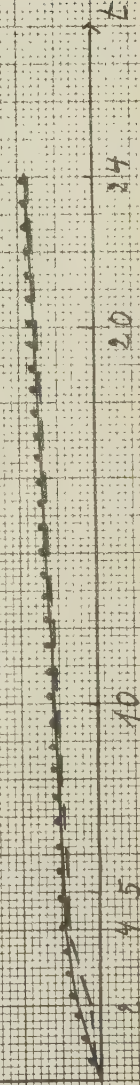
288.88

— Kerne ohne E
— Kerne + 500 EE/ha
... Kerne + 1000 EE/ha

gebildeter Schwefelwasserstoff in μg

bezogen auf 1mg Gesamtfaserstoff

250



28.8.29

a) gleicher Schwefelwasserstoff im $\mu\text{g S/m}^2$
keine ohne Fe

— keine + 500 $\text{E} \mu\text{g/m}^2$

... keine + 1000 $\text{E} \mu\text{g/m}^2$

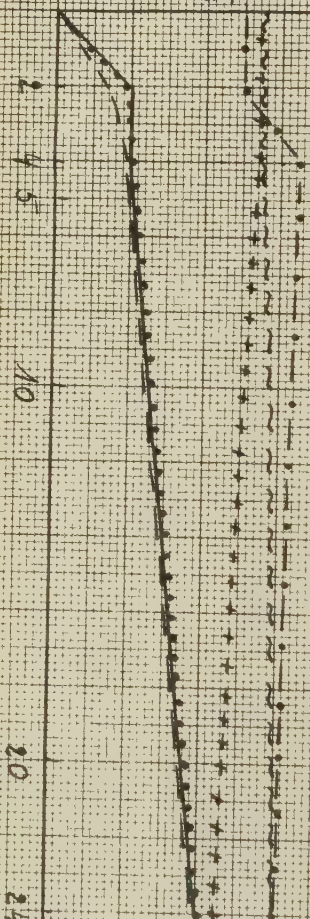
b) Gesamtstickstoff der Bakterien im $\mu\text{g N}_2/\text{m}^2$
keine ohne Fe

+ keine + 500 $\text{E} \mu\text{g/m}^2$

— keine + 1000 $\text{E} \mu\text{g/m}^2$

29.8.29
Lag

8.10.29
Lag



$\mu\text{gS}/\text{mg Bakt. - IV}$

Abb. 30

— Kerne ohne R

-- Kerne + 500 ER/mg

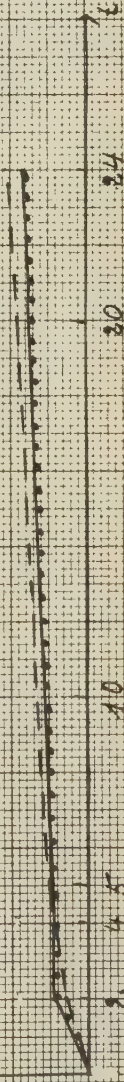
... Kerne + 1000 ER/mg

gebildeter Schwefelwasserstoff in μgS

bezogen auf 1 mg Gesamtschwefelstoff

1.00

0.50



288 31

a) gebl. Edelefer Schwefelwasserstoff im $\mu\text{g}/\text{g}/\text{ml}$

Keime ohne H_2S

--- Keime + 500 $\text{E}/\text{g}/\text{ml}$

... Keime + 1000 $\text{E}/\text{g}/\text{ml}$

b) Gesamthöhe der Bakterien im $\text{mg}/\text{g}/\text{ml}$

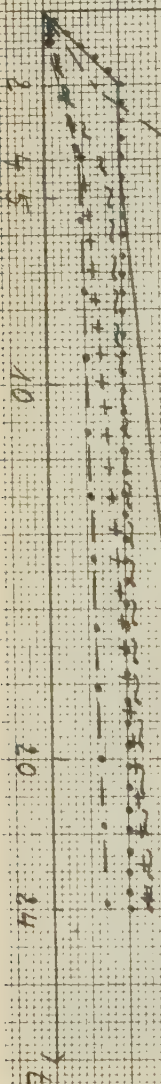
--- Keime ohne H_2S

+ + Keime + 500 $\text{E}/\text{g}/\text{ml}$

--- Keime + 1000 $\text{E}/\text{g}/\text{ml}$

10,05 $\mu\text{g}/\text{g}$

8,010 $\mu\text{g}/\text{g}$



$\mu\text{g/l mg Bakt-N}$

288 32

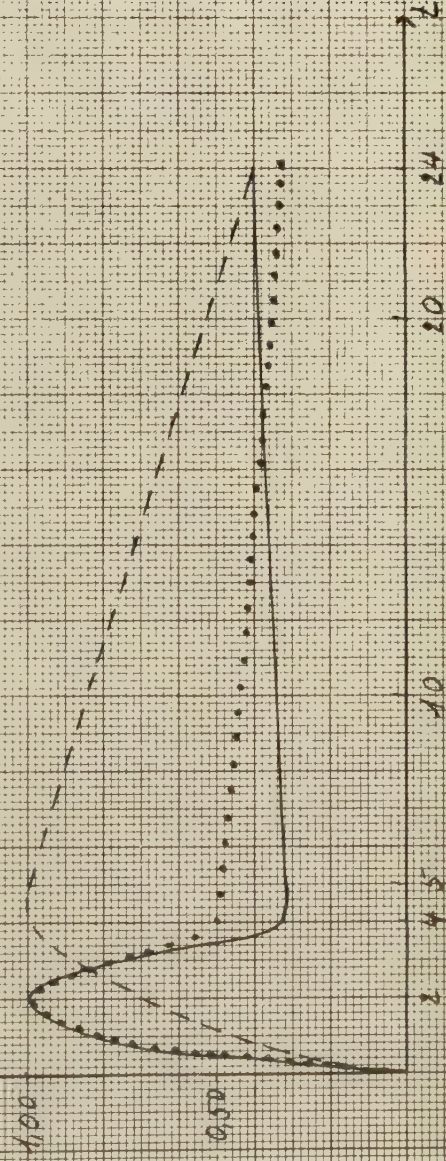
— Kerne ohne B

— Kerne + 500 E B/ml

... Kerne + 1000 E B/ml

geb. Bakter Sauerstoffverbrauch in μg

bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff





spitze wird ein Polyaethylenschlauch gestülpt, der zu einer langen Kapillare ausgezogen ist, die durch das Einleitungsrohr in die Vorlage führt.

Reagentien: Als Treibgas diene Stickstoff.

Die Absorption des Schwefelwasserstoffs erfolgte je nach der zu erwartenden Schwefelmenge bei 0 - 50 Mikrogramm in 1 ml NaOH, bei mehr als 50 Mikrogramm in 2 ml NaOH.

Die Herstellung der 2n Natronlauge erfolgt durch Auflösen von 8 g Natriumhydroxydplätzchen p. a. in 100 ml bidestilliertem Wasser. Die Natronlauge muß in einer Polyaethylenflasche aufbewahrt werden.

Die Titration erfolgt mit einer Cadmiumlösung, deren Normalität entsprechend der zu erwartenden Schwefelwasserstoffmenge zu wählen ist. Zur Herstellung wird reines metallisches Cadmium in 5 ml konz. HCl und 1 ml HNO_3 gelöst und in einer entsprechenden Menge Aqua dest. aufgenommen. In unserem Fall betrug die eingewogene Cadmiummenge 473,1 mg. Diese Menge wurde in 1 l Aqua dest. gelöst. Auf Grund der Äquivalenzen entspricht dann 1 ml Cd.-Lösung 134,8 Mikrogramm Schwefel.

Als Indikator diene Dithizon. Es handelt sich um eine 0,05%ige Lösung von Dithizon p. a. in Aceton. Der Indikator muß in einer braunen Flasche mit Glasstöpsel aufbewahrt werden und ist etwa 3 Wochen haltbar. Indikatormenge: bei 0 - 50 Mikrogramm 0,05 ml, bei mehr als 50 Mikrogramm 0,1 ml. Nach Zugabe des Indikators zur Vorlage muß die Farbe gelb-orange sein und nicht rot, andernfalls ist das Vorlagegefäß gründlich zu reinigen bzw. frische NaOH zu verwenden.

Ausführung: Der mit Keimlösung gefüllte Erlenmeyerkolben wird mit dem Glasschloß des Überleitungsrohres verbunden und ins Wasserbad bei einer Temperatur von 37 - 38° C gesetzt. Man läßt nun langsam N_2 durch die Keimlösung perlen. Die Bürette wird mit Cadmiumlösung gefüllt, so daß der zur Kapillare ausgezogene Polyaethylenschlauch ebenfalls Cadmiumlösung enthält. In das Absorptionsgefäß füllt man die 2n NaOH und führt das Einleitungsrohr ein. Nach der Beschreibung von W. Geilmann und G. Tölg wird nun der Indikator zugegeben. Dies war jedoch in diesem Fall nicht möglich, da bei der langen Versuchsdauer eine Veränderung am Indikator eintrat, deren Ursache nicht ergründet werden konnte. Daher wurde der Indikator erst nach Beendigung der Absorption zugesetzt. Die Farbe der Absorptionslösung ist gelb-orange. Man titriert bis zum Farbumschlag nach rot.

Bakteriologische Arbeitsverfahren:

- 1) Bei den qualitativen Untersuchungen wurden Verdünnungsreihen hergestellt, die Penicillinkonzentrationen von 1 000 - 0,1 E/ml enthielten.

Die Keime, *B. proteus* und *E. coli*, entstammten einer 16 Std. alten Kultur. Die Keimverdünnung betrug 1:100. Bei jeder Verdünnungsreihe wurde eine Kontrolle ohne Penicillin angesetzt.

- 2) Der quantitative Nachweis der beiden Stoffwechselprodukte, Ammoniak und Schwefelwasserstoff, erfolgte bei wachsenden und ruhenden Keimen.

Bei wachsenden Keimen wurden 50 ml Bouillon mit Proteusbakterien oder *E. coli* beimpft und bei 37° C bebrütet. Nach 16 Std. werden 10 ml entnommen und mit 480 ml Bouillon verdünnt. Dazu gab man 10 ml Aqua dest., die bei den Versuchen mit Proteusbakterien so viel Penicillin enthielten, daß die Endkonzentration in den 500 ml 10 und 1 E/ml betrug, bei den Versuchen mit *E. coli* so viel, daß die Endkonzentration 1 000 und 500 E/ml war. Die Penicillindosierung wurde so gewählt, daß sowohl über- als auch subbakteriostatische Konzentrationen vorlagen. Bei der Kontrolle wurde lediglich Aqua dest. ohne Penicillin zugefügt. Zur Ammoniakbestimmung wurden nach 0, 2, 4 und 24 Std. 10 ml abpipettiert. Mit Hilfe der Conway-Kammern wird nun der Ammoniakgehalt der entnommenen Keimlösung festgestellt. Die Ammoniakmenge wird in mgN_2 pro ml Bouillon angegeben.

Um eine Bezugsgröße für die beim Stoffwechsel gebildete Ammoniakmenge zu haben, wurden die Bakterien verascht und dann der Stickstoffgehalt in den Conway-Kammern ermittelt. Zur Bestimmung des Bakterienstickstoffs für den Nullwert wurden 10 ml aus der 16 Std. alten Kultur (s. o.) entnommen und nach zweimaligem Waschen verascht. Der auf diese Weise erhaltene Wert des Bakterienstickstoffs wird dann auf 500 ml umgerechnet. Bei den anderen Werten wurden jeweils 100 ml Keimlösung entnommen und nach Waschen und Zentrifugieren der Bodensatz in 1 ml Aqua dest. aufgenommen und verascht. Der beim Titrieren erhaltene Stickstoffwert entspricht dann der in 100 ml enthaltenen Menge. Die Angabe der Größe des Bakterienstickstoffs erfolgt auch hier in mgN_2/ml .

Bei den graphischen Darstellungen erfolgt eine Angabe der gebildeten Ammoniakmenge pro Milligramm Bakterienstickstoff. Bei der entsprechenden Umrechnung wird der Nullwert von der Ammoniakmenge nach 2, 4 und 24 Std. abgezogen, um die wirklich von den Bakterien gebildete Ammoniakmenge zu erhalten. Diese Werte werden in einer besonderen Tabelle angegeben.

Bei der Überprüfung der Genauigkeit der Methode der Ammoniakbestimmung ergab sich eine Schwankung der zweiten Dezimalstelle um ± 4 .

Durch entsprechende Verdünnung der Titrationslösung hätte man diesen Titrationsfehler verkleinern können. Dies war jedoch bei den hier vorliegenden Verhältnissen nicht möglich, da die Titration in der mittleren Kammer der Conway-Apparatur erfolgen mußte und die bei stärkerer Verdünnung der Titrationslösung zur Neutralisation notwendige Menge das Fassungsvermögen dieser Kammer überstiegen hätte.

Beim quantitativen Nachweis des Schwefelwasserstoffs werden ebenfalls nach 16-stündiger Bebrütung 10 ml entnommen. Diese werden nur mit 180 ml Bouillon verdünnt, denn in diesem Falle muß wegen der anderen Art des chemischen Nachweises jeder Zeitwert neu angesetzt werden, so daß die gesamte Keimlösung am Ende eines Versuches für die Messung des Bakterienstickstoffs verwandt werden kann.

Bei ruhenden Keimen wurde folgende Versuchsanordnung gewählt: 5 Agarplatten werden mit Keimen beimpft und 16 Std. bebrütet. Danach werden die Keime mit Aqua dest. abgeschwemmt und mehrmals gewaschen. Schließlich werden sie in 90 ml Bouillon aufgenommen. Das Penicillin wird in 10 ml Aqua dest. gelöst und der Bouillon zugesetzt. Die Penicillindosen sind die gleichen wie bei wachsenden Bakterien. Versuchszeiten und Arbeitsmethodik zur Erfassung der Ammoniak- und Schwefelwasserstoffmenge bleiben gegenüber den Versuchen bei wachsenden Keimen unverändert.

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Nimmt man an, daß Fäulnisvorgänge an Leichen durch eine vor dem Tode erfolgte Behandlung mit Antibiotika auf Grund einer Beeinflussung der Bakterienfermente verzögert eintreten, dann sind in erster Linie Wirkstoffkonzentrationen von Interesse, die weit im subbakteriostatischen Bereich liegen (s. o.).

In einem orientierenden Versuch wurde deswegen zunächst grob qualitativ untersucht, ob voraussichtlich eine Beziehung besteht zwischen Wachstumshemmung und Ammoniak- bzw. Schwefelwasserstoffbildung (Ergebnisse s. Tab. 1).

Tabelle 1

Orientierender Versuch zum Vergleich der Pc-Wirkung auf Wachstum und Ammoniakbildung durch *B. proteus*.

Reagenzglas	Endkonz. E Pc/ml	Trübung	Grünfärbung NH ₃ -Bildung	Rosafärbung n. Ätherzusatz. NH ₃ -Bildung
1	1 000	-	+	+
2	500	-	+	+
3	250	-	+	+
4	125	-	+	+
5	63	-	+	+
6	31	-	+	+
7	16	-	+	+
8	9	-	+	+
9	4	+	+	+++
10	2	++	+	+++
11	1	+++	+	+++
12	0,5	+++	+	+++
13	0,2	+++	+	+++
14	0,1	+++	+	+++
15	-	+++	+	+++

Aus Tabelle 1 ist zu entnehmen, daß die bakteriostatische Grenze zwischen 4 und 9 E Pc/ml liegt. Ferner ist zu ersehen, daß auch bei den höchsten Penicillinkonzentrationen noch Ammoniak gebildet wird. Eine gewisse Grenze im Ausmaß der Ammoniakbildung scheint im Gebiet der bakteriostatischen Grenzkonzentrationen zu liegen.

Es sei noch darauf verwiesen, daß die nach Zusatz der Lösungen (s. o.) auftretende Grünfärbung sehr dunkel ist, so daß wegen der Farbintensität bei diesem Vorgehen im Gegensatz zu dem Verfahren der Ätherbehandlung eine genauere Aussage nicht gemacht werden kann.

In Tabelle 2 sind die entsprechenden Ergebnisse mit *E. coli* wiedergegeben.

Tabelle 2

Orientierender Versuch zum Vergleich der Pc-Wirkung auf Wachstum und Ammoniakbildung durch *E. coli*

Reagenzglas	Endkonz. E Pc/ml	Trübung	Grünfärbung NH ₃ -Bildung	Rosafärbung n. Ätherzusatz, NH ₃ -Bildung
1	1 000	-	+	+
2	500	+	+	+++
3	250	++	+	+++
4	125	+++	+	+++
5	63	+++	+	+++
6	31	+++	+	+++
7	16	+++	+	+++
8	9	+++	+	+++
9	4	+++	+	+++
10	2	+++	+	+++
11	1	+++	+	+++
12	0,5	+++	+	+++
13	0,2	+++	+	+++
14	0,1	+++	+	+++
15	-	+++	+	+++

Aus Tabelle 2 ist zu entnehmen, daß die Hemmgrenze zwischen 500 und 1 000 E Pc/ml liegt. Auch hier tritt bei den subbakteriostatischen Konzentrationen vermehrt Ammoniak auf, was durch das Wachstum der Bakterien bedingt ist.

In Tabelle 3 und 4 sind die Ergebnisse der orientierenden Versuche mit *B. proteus* bzw. *E. coli* zur Erfassung einer Beziehung zwischen Schwefelwasserstoffbildung und Wachstumshemmung wiedergegeben.

Tabelle 3

Orientierender Versuch zum Vergleich der Pc-Wirkung auf Wachstum und Schwefelwasserstoffbildung durch *B. proteus*

Reagenzglas	Endkonz. E Pc/ml	Trübung	Pb-Acetat- Papier
1	1 000	-	-
2	500	-	-
3	250	-	-
4	125	-	-
5	63	-	-
6	31	-	-
7	16	-	-
8	9	-	-
9	4	+	+
10	2	++	+
11	1	+++	+
12	0,5	+++	+
13	0,2	+++	+
14	0,1	+++	+
15	-	+++	+

Tabelle 4

Orientierender Versuch zum Vergleich der Pc-Wirkung auf Wachstum und Schwefelwasserstoffbildung durch *E. coli*

Reagenzglas	Endkonz. E Pc/ml	Trübung	Pb-Acetat- Papier
1	1 000	-	-
2	500	+	-
3	250	++	+
4	125	+++	+
5	63	+++	+
6	31	+++	+
7	16	+++	+
8	9	+++	+

Reagenzglas	Endkonz. E Pc/ml	Trübung	Pb-Acetat- Papier
9	4	+++	+
10	2	+++	+
11	1	+++	+
12	0,5	+++	+
13	0,2	+++	+
14	0,1	+++	+
15	-	+++	+

Aus Tabelle 3 und 4 ist zu entnehmen, daß bei Überschreiten des bakteriostatischen Grenzwertes die Schwefelwasserstoffbildung gebremst wird. Es besteht auch hier eine Parallelität zwischen Wachstumshemmung und Schwefelwasserstoffbildung. Es sei aber betont, daß es sich hierbei nur um grob qualitative Versuche handelt, die mit quantitativen Methoden zu überprüfen sind (s. u.). Dies gilt besonders für den Versuch mit *E. coli*, da hierbei Schwefelwasserstoff bei einer gerade subbakteriostatischen Penicillinkonzentration nicht in faßbarer Menge gebildet wurde.

In Tabelle 5 sind die von ruhenden Proteusbakterien gebildeten Mengen Ammoniak ausgedrückt in mgN_2/ml unter Einfluß von Penicillin wiedergegeben. Diese Werte sind zu beziehen auf die zu den einzelnen Versuchsschnitten gemessenen Mengen Bakterienstickstoff pro Milliliter (Tabelle 6). Es sei betont, daß bei sehr hohen Keimkonzentrationen ein nennenswertes Wachstum der Bakterien nicht eintritt. Deswegen ist auch nicht zu erwarten, daß man mit sonst bakteriostatischen Penicillinkonzentrationen eine Beeinflussung der Keimkonzentration gemessen am Gesamtstickstoff erhält. In einer Tabelle 5a wird außerdem die von *B. proteus* gebildete Ammoniakmenge abzüglich des Nullwertes angegeben. In Tabelle 6a ist die von ruhenden Proteusbakterien gebildete Ammoniakmenge bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff aufgeführt.

Tabelle 5

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *B. proteus* (Ruhekeime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml	20 E Pc/ml
0	0,90	0,92	0,90	0,95
4	1,06	1,09	1,06	1,12
24	1,63	1,65	1,63	1,63

Tabelle 5a

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *B. proteus* (Ruhekeime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml abzüglich Nullwert)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml	20 E Pc/ml
Vor Versuchsbeginn	0,90	0,92	0,90	0,95
4	0,16	0,17	0,16	0,17
24	0,73	0,73	0,73	0,68

Tabelle 6

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN_2/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml	20 E Pc/ml
0	0,20	0,20	0,18	0,13
4	0,20	0,20	0,18	0,13
24	0,25	0,22	0,18	0,13

Tabelle 6a

Von ruhenden Proteusbakterien gebildetes Ammoniak in mgN_2 bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml	20 E Pc/ml
4	0,80	0,85	0,88	1,31
24	2,92	3,28	4,01	5,24

Aus Tabelle 5 und 6 ist zu entnehmen, daß der Vorstellung entsprechend der Bakteriengesamtstickstoff während der Versuchszeit praktisch nicht zunimmt. Vergleicht man die gebildeten Ammoniakmengen von Versuch und Kontrolle, so ist die Frage, ob eine Zunahme der Ammoniakbildung erfolgt ist, schwer zu beantworten. Deutlicher lassen sich die Verhältnisse bei einer graphischen Darstellung beurteilen (Abb. 1). Bei allen vier Versuchsansätzen ist eine ziemlich gleiche Zunahme der Ammoniakbildung zu beobachten. Die unterschiedlichen Werte des Bakteriengesamtstickstoffs scheinen nicht bezeichnend zu sein. Trägt man nun die pro Milligramm Bakterienstickstoff gebildete Ammoniakmenge graphisch auf (Abb. 2), dann scheint das meiste Ammoniak im Versuch mit der höchsten Penicillinkonzentration gebildet worden zu sein. Die Werte des Versuchs mit 10 E Pc/ml liegen zwischen denen des Versuchs mit 1 E Pc/ml und denen von 20 E Pc/ml. Die Unterschiede sind zwar nicht sehr groß. Sie bedürfen aber dennoch einer Kontrolle durch eine Wiederholung des Versuchs.

Die Ergebnisse der Wiederholung dieses Versuchs sind in Tab. 7, 7a, 8 und 8a bzw. in Abb. 3 und 4 wiedergegeben.

Tabelle 7

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *B. proteus* (Ruhekeime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml
0	0,80	0,80	0,80
2	0,87	0,87	0,87
4	0,94	0,94	0,94
24	1,48	1,48	1,48

Tabelle 7 a

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *B. proteus* (Ruhekeime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN₂/ml abzüglich Nullwert)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml
Vor Versuchsbeginn	0,80	0,80	0,80
2	0,07	0,07	0,07
4	0,14	0,14	0,14
24	0,68	0,68	0,68

Tabelle 8

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN₂/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml
0	0,22	0,25	0,25
2	0,25	0,25	0,25
4	0,25	0,25	0,25
24	0,29	0,29	0,25

Tabelle 8 a

Von ruhenden Proteusbakterien gebildetes Ammoniak in mgN₂ bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml
2	0,28	0,28	0,28
4	0,56	0,56	0,56
24	2,31	2,31	2,72

Aus Tabelle 7 und 8 bzw. aus Abb. 3 und 4 ist zu entnehmen, daß auch hier praktisch keine Vermehrung der Bakterien eingetreten ist, und daß durch die Anwesenheit von Penicillin im Ansatz keine nennenswerte Beeinflussung der Ammoniakbildung auftrat. Im Vergleich zur ersten Versuchsreihe ist aber zu sagen, daß bei 10 E Pc zwar ebenfalls eine ganz geringe Zunahme der Am-

moniakmenge gemessen wurde. Diese ist aber in diesem Falle sehr viel geringer und bei 1 E Pc/ml überhaupt nicht mehr nachzuweisen. Es dürfte deswegen durchaus berechtigt sein, die Versuche dahingehend zu deuten, daß die Ammoniakbildung durch *B. proteus* unter Verwendung von ruhenden Keimen weder von über- noch von subbakteriostatischen Penicillinkonzentrationen beeinflusst wird.

Bei der quantitativen Untersuchung der Ammoniakbildung durch wachsende *Proteus*keime wurden aus technischen Gründen die Versuche mit 1 (subbakteriostatische Konzentration) und 10 E Pc/ml (bakteriostatische Konzentration) getrennt mit je einem Vergleichswert ohne Penicillin angesetzt (Ergebnisse: Tab. 9, 9 a, 10, 10 a bzw. 11, 11 a, 12, 12 a, sowie Abb. 5-8).

Tabelle 9

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *B. proteus* (wachsende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	10 E Pc/ml
0	0,95	0,95
2	1,01	1,01
4	1,06	1,06
24	1,34	1,01

Tabelle 9 a

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *B. proteus* (wachsende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml abzüglich Nullwert)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	10 E Pc/ml
Vor Versuchsbeginn	0,95	0,95
2	0,06	0,06
4	0,11	0,11
24	0,39	0,06

In Tabelle 10 sind die Werte des Bakterienstickstoffs als Bezugsgröße aufgeführt. Tabelle 10 a zeigt die Werte der gebildeten Ammoniakmenge umgerechnet pro Milligramm Bakterienstickstoff.

Tabelle 10

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN_2/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	10 E Pc/ml
0	0,003	0,003
2	0,07	Ergebnis nicht verwertbar
4	0,11	0,03
24	0,26	0,03

Tabelle 10a

Von wachsenden Proteuskeimen gebildetes Ammoniak in mgN_2 bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	10 E Pc/ml
2	0,86	Ergebnis nicht verwertbar
4	1,00	3,67
24	1,50	2,00

Aus Tabelle 10 ist deutlich der bakteriostatische Effekt der hohen Penicillinkonzentration ersichtlich. Folge des geringeren Wachstums der Keime ist natürlich auch eine kleinere Ammoniakmenge (s. Tab. 9). Der Verlauf der Kurven in Abb. 5 ist entsprechend. Bei der Umrechnung des gebildeten Ammoniaks pro Milligramm Bakterienstickstoff ergibt sich bei Anwesenheit von Penicillin ein starker Anstieg der Kurve in den ersten 4 Std. der Bebrütung und ein Absinken in den weiteren 20 Bebrütungsstunden (Abb. 6). Das Maximum nach einer Bebrütungsdauer von 4 Std. kommt dadurch zustande, daß bei der zunächst geringeren Keinzahl die pro Bakterieneinheit gebildete Ammoniakmenge (angegeben in N_2/ml) wesentlich größer ist als nachher. Das besagt, daß durch die gerade bakteriostatische Penicillinkonzentration die Keimvermehrung im wesentlichen aufhört, was auch aus Abb. 5 ersichtlich ist. Dennoch wird bis zur Beobachtungszeit von 4 Std. noch Ammoniak gebildet. Die fermentative Leistung der Keime ist also zunächst noch nicht behindert. Bei einer längeren Bebrütungszeit nimmt aber auch die fermentative Leistung ab.

Natürlich wäre auch an die Möglichkeit einer Aktivierung der fermentativen Leistung der Keime durch Penicillin zu denken. Wäre dies der Fall, dann müßte auch bei Bakterien, die sich nicht vermehren, also bei sog. Ruhekeimen, unter Penicillin eine Zunahme der Ammoniakbildung im Gegensatz zur Kontrolle zu beobachten sein. Dies war aber nicht der Fall, wie aus Abb. 2 und 4 hervorgeht.

Derselbe Versuch wurde mit einer unerschwelligen Penicillinkonzentration von 1 E Pc/ml durchgeführt (s. Tab. 11, 11a, 12, 12a, sowie Abb. 7 und 8).

Tabelle 11

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *B. proteus* (wachsende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml
0	0,43	0,43
2	0,47	0,47
4	0,49	0,51
24	0,63	0,62

Tabelle 11a

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *B. proteus* (wachsende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml abzüglich Nullwert)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml
Vor Versuchsbeginn	0,43	0,43
2	0,04	0,04
4	0,06	0,08
24	0,20	0,19

Tabelle 12

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN_2/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml
0	0,003	0,003
2	0,02	0,02
4	0,04	0,04
24	0,07	0,08

Tabelle 12a

Von wachsenden Proteuskeimen gebildetes Ammoniak in mgN_2 bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml
2	2,00	2,00
4	1,50	2,50
24	2,86	2,38

Aus Tab. 11 und 12, sowie Abb. 7 und 8 ist zu entnehmen, daß bei dieser unerschwelligen Penicillinkonzentration die Ammoniakbildung pro Bakterieneinheit im zeitlichen Ablauf völlig der der Kontrolle entspricht. Die geringe Überhöhung der Kontroll- und Versuchskurve (Abb. 8) ist darauf zurückzuführen, daß der einzelne Keim zu Beginn der Kulturentwicklung fermentativ stärker wirksam ist als nachher. Bedenkt man, daß die Einsaatdosis etwa einer auf $0,2 \times 10^{-1}$ verdünnten 16 Stunden alten Bouillonkultur entspricht, also vergleichbar einer Keimkonzentration von etwa $2 \times 10^7/\text{ml}$, dann ist die M- oder Maximalkonzentration an Keimen und damit deren Kulminationspunkt sehr schnell erreicht. Nach diesem Zeitpunkt ist die Zahl der wachsenden Keime kleiner als die der absterbenden. Dieser Versuch besagt also auf jeden Fall, daß die anfänglich beobachtete Überhöhung der Kurve (Abb. 8) nicht bedingt ist durch eine Stimulierung der fermentativen Leistung durch Penicillin.

Der eben besprochene Versuch wurde in einer Wiederholung verifiziert (Tab. 13, 13a, 14, 14a, sowie Abb. 9 und 10).

Tabelle 13

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *B. proteus* (wachsende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml
0	0,54	0,54
2	0,59	0,60
4	0,66	0,63
24	0,83	0,83

Tabelle 13a

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *B. proteus* (wachsende Keime) durch penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml abzüglich Nullwert)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml
Vor Versuchsbeginn	0,54	0,54
2	0,05	0,06
4	0,12	0,09
24	0,29	0,29

Tabelle 14

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN_2/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml
0	0,002	0,002
2	0,02	0,02
4	0,03	0,03
24	0,09	0,10

Tabelle 14a

Von wachsenden *Proteus*keimen gebildetes Ammoniak in mgN_2 bzogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml
2	2,50	3,00
4	4,00	2,00
24	3,33	2,90

Aus Tab. 13 und 14, sowie Abb. 9 und 10 ist zu entnehmen, daß prinzipiell genau dasselbe Resultat erzielt wurde. Die Ergebnisse können deshalb als bestätigt angesehen werden.

Analog zu den eben beschriebenen Versuchen mit *B. proteus* wurden die nachfolgenden Experimente mit *E. coli* durchgeführt.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Ammoniakbildung durch sog. Ruhekeime untersucht. (Ergebnisse: Tab. 15, 15a, 16, 16a, sowie Abb. 11 und 12). Penicillin wurde in zwei Konzentrationen von 500 und 1 000 E/ml benutzt. Das entspricht nach der Resistenzprüfung des Stammes einer knapp subbakteriostatischen und einer gerade noch überbakteriostatischen Konzentration.

Tabelle 15

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *E. coli* (ruhende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
0	0,85	0,85	0,85
2	0,87	0,88	0,87
4	0,91	0,91	0,93
24	1,07	1,05	1,07

Tabelle 15a

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *E. coli* (ruhende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml abzüglich Nullwert)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
Vor Versuchsbeginn	0,85	0,85	0,85
2	0,02	0,03	0,02
4	0,06	0,06	0,08
24	0,22	0,20	0,22

Tabelle 16

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN_2/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
0	0,23	0,22	0,25
2	0,25	0,25	0,25
4	0,25	0,25	0,25
24	0,25	0,25	0,25

Tabelle 16a

Von ruhenden Colikeimen gebildetes Ammoniak in mgN_2 bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
2	0,08	0,12	0,08
4	0,24	0,24	0,32
24	0,88	0,80	0,88

Aus Tab. 15 und 16 bzw. Abb. 11 und 12 ist eindeutig zu entnehmen, daß die Kurven für die beiden Versuchsreihen und die Kontrollreihe völlig gleich verlaufen. Eine Beeinflussung der Ammoniakbildung durch subbakteriostatische und überbakteriostatische Penicillinkonzentrationen findet aber bei sog. Ruhekeimen nicht statt. Dies entspricht dem Ergebnis mit *B. proteus* bei der gleichen Versuchsanordnung.

Natürlich wurde auch dieser Versuch wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tab. 17, 17a, 18, 18a, sowie in Abb. 13 und 14 wiedergegeben.

Tabelle 17

Beeinflussung der Ammoniakbildung von E. coli (ruhende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
0	0,81	0,81	0,81
2	0,84	0,85	0,84
4	0,87	0,87	0,87
24	1,03	1,05	1,05

Tabelle 17a

Beeinflussung der Ammoniakbildung von E. coli (ruhende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml abzüglich Nullwert)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
Vor Versuchsbeginn	0,81	0,81	0,81
2	0,03	0,04	0,03
4	0,06	0,06	0,06
24	0,22	0,24	0,24

Tabelle 18

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN_2/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
0	0,20	0,20	0,20
2	0,21	0,21	0,21
4	0,21	0,21	0,21
24	0,21	0,21	0,21

Tabelle 18a

Von ruhenden Colikeimen gebildetes Ammoniak in mgN_2 bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
2	0,14	0,19	0,14
4	0,29	0,29	0,29
24	1,05	1,14	1,20

Aus Tab. 17 und 18, sowie aus Abb. 13 und 14 ist zu entnehmen, daß sich die obigen Resultate völlig reproduzieren lassen.

Analog den Versuchen mit *B. proteus* wurde auch mit *E. coli* in einer wachsenden Kultur untersucht, ob eine bakteriostatische Penicillinkonzentration (1 000 E Pc/ml) die Ammoniakbildung beeinflußt (Ergebnisse: Tab. 19, 19a, 20, 20a, sowie Abb. 15 und 16).

Tabelle 19

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *E. coli* (wachsende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 000 E Pc/ml
0	0,76	0,76
2	0,78	0,76
4	0,81	0,80
24	0,95	0,78

Tabelle 19a

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *E. coli* (wachsende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml abzüglich Nullwert)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 000 E Pc/ml
Vor Versuchsbeginn	0,76	0,76
2	0,02	0,00
4	0,05	0,04
24	0,19	0,02

Tabelle 20

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN_2/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 000 E Pc/ml
0	0,006	0,006
2	0,01	0,01
4	0,02	0,01
24	0,12	0,02

Tabelle 20 a

Von wachsenden Colikeimen gebildetes Ammoniak in mgN_2 bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 000 E Pc/ml
2	2,00	-
4	2,50	4,00
24	1,58	1,00

Aus Tab. 19 und 20, sowie aus Abb. 15 und 16 ist zu entnehmen, daß prinzipiell dasselbe Resultat erzielt wurde wie bei den entsprechenden Versuchen mit Proteusbakterien. Damit gilt auch für dieses Ergebnis dieselbe Erklärung.

In einem weiteren Versuch wurde mit *E. coli* untersucht, ob eine subbakteriostatische Penicillinkonzentration einen Einfluß auf die Ammoniakbildung durch wachsende Keime hat (Ergebnisse: Tab. 21, 21 a, 22, 22 a, sowie Abb. 17 und 18).

Tabelle 21

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *E. coli* (wachsende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml
0	0,53	0,53
2	0,56	0,56
4	0,59	0,59
24	1,04	1,05

Tabelle 21a

Beeinflussung der Ammoniakbildung von *E. coli* (wachsende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml abzüglich Nullwert)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml
Vor Versuchsbeginn	0,53	0,53
2	0,03	0,03
4	0,06	0,06
24	0,51	0,52

Tabelle 22

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN_2/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml
0	0,004	0,004
2	0,01	0,01
4	0,02	0,02
24	0,15	0,14

Tabelle 22a

Von wachsenden Colikeimen gebildetes Ammoniak in mgN_2 bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml
2	3,00	3,00
4	3,00	3,00
24	3,40	3,71

Aus Tab. 21 und 22, sowie Abb. 17 und 18 ist zu entnehmen, daß die Ergebnisse analog denen mit *B. proteus* sind.

Die folgenden Ergebnisse stellen eine Wiederholung des obigen Versuchs unter identischen Bedingungen dar (Tab. 23, 23 a, 24, 24 a, sowie Abb. 19 und 20).

Tabelle 23

Beeinflussung der Ammoniakbildung von E. coli (wachsende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml
0	0,72	0,72
2	0,76	0,76
4	0,79	0,79
24	0,87	0,87

Tabelle 23a

Beeinflussung der Ammoniakbildung von E. coli (wachsende Keime) durch Penicillin (Ammoniak in mgN_2/ml abzüglich Nullwert)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml
Vor Versuchsbeginn	0,72	0,72
2	0,04	0,04
4	0,07	0,07
24	0,11	0,11

Tabelle 24

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN_2/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml
0	0,005	0,005
2	0,01	0,01
4	0,02	0,02
24	0,13	0,13

Tabelle 24a

Von wachsenden Colikeimen gebildetes Ammoniak in mgN_2 bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml
2	4,00	4,00
4	3,50	3,50
24	0,84	0,84

Aus Tab. 23 und 24, sowie Abb.19 und 20 ist zu entnehmen, daß die Ergebnisse mit dem Proteusversuch übereinstimmen wie ja auch der vor-
ausgegangene Versuch zeigte.

Untersuchung der Schwefelwasserstoffbildung durch *B. proteus* und *E. coli*

Auch bei diesen Versuchen wurde ein Unterschied gemacht zwischen der Leistung von sog. Ruhekeimen und von solchen in einer wachsenden Kultur. Die Penicillinkonzentrationen waren die gleichen wie bei den Ammoniakversuchen. Es sei schon jetzt darauf verwiesen, daß die Ergebnisse größeren Schwankungen unterliegen, da jeder Versuch gesondert ausgeführt werden mußte. Im Gegensatz zur Ammoniakbestimmung konnte also nicht nach den gewünschten Bebrütungszeiten eine Probe aus demselben Ansatz entnommen werden. Um die Einsaatdosis bei den einzelnen Versuchen weitgehend konstant zu halten, wurde dieselbe bei $+5 - +8^\circ$ zur Verhinderung einer Keimvermehrung aufbewahrt und dann bei den zusammengehörenden Versuchen benutzt.

Die Versuche mit sog. Ruhekeimen von *B. proteus* sind in Tab. 25 und 26, sowie Abb. 21 und 22 wiedergegeben. In einer Zusatztablette 26 a wird die pro Milligramm Bakterienstickstoff gebildete Schwefelwasserstoffmenge angegeben.

Tabelle 25

Beeinflussung der Schwefelwasserstoffbildung von *B. proteus* (ruhende Keime) durch Penicillin (Schwefelwasserstoff in Mikrogramm S/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml
2	0,01	0,01	0,01
4	0,02	0,02	0,02
24	0,05	0,03	0,05

Tabelle 26

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN_2/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml
2 vor	0,08	0,08	0,08
2 nach	0,08	0,08	0,09
4 vor	0,08	0,06	0,06
4 nach	0,08	0,06	0,06
24 vor	0,08	0,08	0,08
24 nach	0,08	0,08	0,09

Tabelle 26a

Von ruhenden Proteuskeimen gebildeter Schwefelwasserstoff in Mikrogramm S bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml
2	0,12	0,12	0,12
4	0,25	0,33	0,33
24	0,62	0,37	0,62

Aus Tab. 25 und 26, sowie aus Abb. 21 und 22 ist zu entnehmen, daß die Schwefelwasserstoffbildung bei Versuch und Kontrolle gleichsinnig verläuft. Eine Ausnahme scheint der Vierundzwanzigstundenwert des Versuchs mit der subbakteriostatischen Penicillinkonzentration von 1 E Pc/ml darzustellen. Da

es sich um einen einzigen Wert handelt, ist eher anzunehmen, daß es sich um einen zufallsbedingten Fehler handelt. Dies wird in einer Wiederholung der Versuchsreihe zu kontrollieren sein. Man kann demnach zunächst annehmen, daß Penicillin weder in subbakteriostatischen noch in bakteriostatischen Bereichen die Schwefelwasserstoffbildung bei praktisch ruhenden Proteuskeimen beeinflußt.

Dieser Versuch wurde unter identischen Bedingungen wiederholt. (Ergebnisse s. Tab. 27, 28, 28 a, sowie Abb. 23 und 24).

Tabelle 27

Beeinflussung der Schwefelwasserstoffbildung von *P. proteus* (ruhende Keime) durch Penicillin (Schwefelwasserstoff in Mikrogramm S/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml
2	0,01	0,01	0,01
4	0,03	0,02	0,03
24	0,05	0,05	0,05

Tabelle 28

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN₂/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml
2 vor	0,11	0,11	0,11
2 nach	0,11	0,11	0,11
4 vor	0,11	0,11	0,12
4 nach	0,10	0,10	0,12
24 vor	0,18	0,11	0,16
24 nach	0,17	0,13	0,13

Tabelle 28a

Von ruhenden Proteuskeimen gebildeter Schwefelwasserstoff in Mikrogramm S bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml
2	0,09	0,09	0,08
4	0,30	0,20	0,25
24	0,29	0,38	0,38

Aus Tab. 27 und 28, sowie aus Abb. 23 und 24 geht hervor, daß in der Tat keine Beeinflussung der Schwefelwasserstoffbildung durch sog. Ruhekeime in Anwesenheit von Penicillin erfolgt.

Es wurde ferner untersucht, ob Penicillin in subbakteriostatischen und bakteriostatischen Konzentrationen einen Einfluß auf die Schwefelwasserstoffbildung durch wachsende Proteuskeime hat (Ergebnisse s. Tab. 29, 30, 30 a, sowie Abb. 25 und 26).

Tabelle 29

Beeinflussung der Schwefelwasserstoffbildung von *B. proteus* (wachsende Keime) durch Penicillin (Schwefelwasserstoff in Mikrogramm S/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml
2	0,009	0,01	0,009
4	0,01	0,01	0,01
24	0,05	0,04	0,02

Tabelle 30

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN₂/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml
2 vor	0,0004	0,0003	0,0006
2 nach	0,01	0,01	0,01
4 vor	0,0005	0,0006	0,0004
4 nach	0,02	0,02	0,01
24 vor	0,0006	0,0007	0,0006
24 nach	0,06	0,05	0,03

Tabelle 30a

Von wachsenden Proteuskeimen gebildeter Schwefelwasserstoff in Mikrogramm S bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	1 E Pc/ml	10 E Pc/ml
2	0,90	1,00	0,90
4	0,50	0,50	1,00
24	0,83	0,80	0,67

Aus Tab. 29 und 30, sowie aus Abb. 25 und 26 ist zu entnehmen, daß ähnlich wie bei der Untersuchung der Ammoniakbildung bei 2 oder 4 Stunden ein Kurvengipfel (Abb. 26) auftritt. Diese Erscheinung verläuft aber bei Versuch und Kontrolle gleichsinnig. Der weitere Kurvenverlauf (Abb. 26) besagt, daß im wesentlichen die Schwefelwasserstoffbildung in Abhängigkeit von der Wachstumsintensität vonstatten geht. Bei einer durch die bakterio- statische Penicillinkonzentration bedingten Wachstumshemmung ist auch eine Verringerung der Schwefelwasserstoffbildung zu beobachten (Abb. 25). Subbakteriostatische Penicillinkonzentrationen haben entsprechend auf die Schwefelwasserstoffbildung und das Wachstum gemessen am Bakteriengesamtstickstoff keinen Einfluß.

Eine weitere Versuchsreihe mit sog. Ruhekeimen von E. coli in Gegenwart von einer knapp bakteriostatischen und einer subbakteriostatischen Penicillinkonzentration wurde ebenfalls durchgeführt (Ergebnisse s. Tab. 31, 32, 32 a, sowie Abb. 27 und 28).

Tabelle 31

Beeinflussung der Schwefelwasserstoffbildung von E. coli (ruhende Keime) durch Penicillin (Schwefelwasserstoff in Mikrogramm S/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
2	0,007	0,003	0,007
4	0,01	0,01	0,01
24	0,02	0,02	0,02

Tabelle 32

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN_2/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
2 vor	0,11	0,11	0,11
2 nach	0,11	0,11	0,11
4 vor	0,11	0,11	0,11
4 nach	0,11	0,11	0,11
24 vor	0,11	0,13	0,11
24 nach	0,11	0,11	0,11

Tabelle 32a

Von ruhenden Colikeimen gebildeter Schwefelwasserstoff in Mikrogramm S bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
2	0,06	0,03	0,06
4	0,09	0,09	0,09
24	0,18	0,18	0,18

Aus Tab. 31 und 32, sowie aus Abb. 27 und 28 ist zu entnehmen, daß Penicillin in beiden Konzentrationsbereichen die Schwefelwasserstoffbildung auch bei längerer Beobachtungszeit nicht beeinträchtigt.

Derselbe Versuch wurde mit der gleichen Anordnung wiederholt (Ergebnisse s. Tab. 33, 34, 34a, sowie Abb. 29 und 30).

Tabelle 33

Beeinflussung der Schwefelwasserstoffbildung von *E. coli* (ruhende Keime) durch Penicillin (Schwefelwasserstoff in Mikrogramm S./ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
2	0,01	0,007	0,009
4	0,01	0,01	0,01
24	0,02	0,02	0,02

Tabelle 34

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN_2/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
2 vor	0,11	0,11	0,09
2 nach	0,11	0,11	0,10
4 vor	0,11	0,09	0,13
4 nach	0,11	0,11	0,13
24 vor	0,13	0,09	0,12
24 nach	0,12	0,09	0,12

Tabelle 34a

Von ruhenden Colikeimen gebildeter Schwefelwasserstoff in Mikrogramm S bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
2	0,09	0,06	0,08
4	0,09	0,09	0,08
24	0,17	0,22	0,17

Aus Tabelle 33 und 34, sowie aus Abb. 29 und 30 ist zu entnehmen, daß sich die bei der letzten Versuchsreihe gemachte Aussage bestätigen läßt.

Analog zu den Versuchen mit Proteusbakterien wurde untersucht, ob Penicillin bei subbakteriostatischen und wachstumshemmenden Konzentrationen die Schwefelwasserstoffbildung von wachsenden Colibakterien beeinträchtigt (Ergebnisse s. Tab. 35, 36, 36 a, sowie Abb. 31 und 32)

Tabelle 35

Beeinflussung der Schwefelwasserstoffbildung von E. coli (wachsende Keime) durch Penicillin (Schwefelwasserstoff in Mikrogramm S/ml)

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
2	0,01	0,007	0,01
4	0,01	0,02	0,01
24	0,02	0,02	0,01

Tabelle 36

Menge des Bakterienstickstoffs in mgN₂/ml

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
2 vor	0,0006	0,0006	0,0006
2 nach	0,01	0,01	0,01
4 vor	0,0006	0,0004	0,0006
4 nach	0,03	0,02	0,02
24 vor	0,0004	0,0006	0,0004
24 nach	0,05	0,05	0,03

Tabelle 36a

Von wachsenden Colikeimen gebildeter Schwefelwasserstoff in Mikrogramm S bezogen auf 1 mg Gesamtstickstoff

Bebrütungsdauer, Std.	Ohne Pc	500 E Pc/ml	1 000 E Pc/ml
2	1,00	0,70	1,00
4	0,33	1,00	0,50
24	0,40	0,40	0,33

Aus Tab. 35 und 36, sowie aus Abb. 31 und 32 ergibt sich ein den eben besprochenen Resultaten gleichsinniges Ergebnis.

DISKUSSION

Die Versuche ergaben, daß die Ammoniak- und Schwefelwasserstoffbildung durch ruhende und wachsende Keime von *B. proteus* und *E. coli* durch Penicillin weder in subbakteriostatischen noch in wachstumshemmenden Konzentrationen beeinträchtigt wird. Die Analysen unterliegen natürlich einem gewissen Fehler, der entsprechend der erforderlichen Versuchsanordnung bei der Schwefelwasserstoffbestimmung größer ist als bei der Ammoniakbestimmung. Auf die Fehlermöglichkeiten wurde verwiesen. Sie überschreiten nicht eine Größe, durch die die Auswertung der Versuche unmöglich geworden wäre.

Überdies wurden fast alle Versuchsreihen wiederholt. Die Resultate waren stets völlig gleichsinnig.

Es konnte ferner festgestellt werden, daß die Ammoniak- und Schwefelwasserstoffbildung in Kulturen, in denen der Kulminationspunkt der Wachstumskurve noch nicht erreicht war, pro Bakterieneinheit (1 mg Gesamtstickstoff) auch in Gegenwart von Penicillin größer war als zu einem späteren Zeitpunkt der Kultur. Diese Beobachtung bestätigt wiederum, daß Penicillin die Ammoniak- und Schwefelwasserstoffbildung nicht beeinträchtigt. Erst mit dem Absterben der Keime nimmt auch die Ammoniak- und Schwefelwasserstoffbildung ab.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit sog. Ruhekeimen als auch mit sich vermehrenden Zellen von *E. coli* und *B. proteus* konnte gezeigt werden, daß Penicillin die Ammoniak- und Schwefelwasserstoffbildung nicht beeinträchtigt. Dabei ließen sich Wachstum und Fermentaktivität differenzieren. Sowohl mit subbakteriostatischen als auch mit Hemmkonzentrationen von Penicillin wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Alexander, H.E., and G. Leidy: Induction of streptomycin resistance in sensitive hemophilus influenzae by extracts containing desoxyribonucleic acid. J.exp.Med. 97, 17, 1953
- 2) Barkulis, J.L.: Inhibition of the anaerobic pyruvate dissimilation in Esch. coli by dihydrostreptomycin. J.Bact. 61, 375, 1951
- 3) Barkulis, J.L.: Inhibition of the anaerobic pyruvate metabolism of Esch. coli by dihydrostreptomycin. J.Bact. 61, 375, 1951
- 4) Beljanski, M.: Comparision des souches bactériennes résistantes à des antibiotiques avec des souches sensibles de même espèce. Ann. Inst. Pasteur 84, 402, 1953
- 5) Bernheim, F.: The effect of certain antibiotics on the formation of an adaptative enzyme in a strain of Ps. aeruginosa. J.Pharmacol. 110, 115, 1954
- 6) Best, Ch.H., and M.B. Taylor: The physiological basis of medical practice. Sixth Edition. The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1955
- 7) Blaich; zit. in Eger, Wilhelm: Lebernekrosen und ihre Beeinflussung durch Penicillin, Ärztl. Forschung 517, 1954
- 8) Blaich, W. und U. Gerlach: Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des Penicillins. Arch. Derm. 194, 277, 1952
- 9) Camuri, M.: Influenza della neomycina sulla respirazione in vitro dello staphilococco aureo e del coli bacillo. Boll. Soc. ital. Biol. sper. 30, 816, 1954
- 10) Conway, E.J., and A. Byrne: An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. The Biochemical Journal Vol. 27, No.2, 419 - 429, 1933
- 11) Crema, A. e. F. Baroli: Azione della terramycina sulla respirazione di alcuni germi e di alcuni tessuti. Boll. Soc. ital. Biol. sper. 29, 129, 1953
- 12) Crone-Münzenbrock, A.: Experimentelle Untersuchungen zur Pankreasfermentaktivierung durch Penicillin. Klin. Wschr. 29, 559, 1951
- 13) Dimarco, A., and L. Baretti: On the complex formed by streptomycin and basic dyes with ribonucleic acid. Enzymologia 14, 141, 1950
- 14) Dragstedt; zit. in Markowitz, J., A. Rappaport, A.C. Scott: Die Funktion der Leberarterie bei Hunden. American Journal of Digestive Diseases. Vol. 16, 344, 1944

- 15) Dudani, A. T., and C. R. Krishnamurti: Oxydation of ascorbic acid by terramycin. *Biochim. biophysic. Acta.* 108, 167, 1953
- 16) Ebel, J. P., R. Vendrely et R. Tulasne: Action de la pénicilline sur le métabolisme phosphoré et azote du *Proteus vulgaris*. *Comptes Rendus de la Société de Biologie. Année* 102, 199, 1950
- 17) Eger, Wilh.: Lebernekrosen und ihre Beeinflussung durch Penicillin. *Ärztl. Forschung*, 17, 1954
- 18) Fitzgerald, R. J., and F. Bernheim: The effect of streptomycin on the formation of adaptative enzymes. *J. Bact.* 55, 765, 1948
- 19) Florey, N. W. und Mitarbeiter: *Antibiotics*. Oxford University Press, London/New York/Toronto. 1949
- 20) Gale, E. F., and J. P. Folkes: The assimilation of amino acids by bacteria. *Biochem. J.* 53, 493, 1952
- 21) Gause, G. F.: Recent studies on Albomycin a new antibiotic. *Brit. med. J.* 2, 1177, 1955
- 21a) Geilmann, W. und G. Tölg: Die Bestimmung des Sulfatgehaltes. *Zeitschrift für Glaskunde.* 33, 1960, H. 9, S. 332 - 338
- 22) Green, D. G.: The cyclopherase system. *Enzyme and enzyme system.* Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1951
- 23) Gros, F., M. Beljanski, and M. Macheboeuf: Action de la pénicilline sur le métabolisme de l'acide ribonucléique chez *staphylococcus aureus*. *Bull. Soc. Chim. Biol. Paris* 33, 1686, 1951
- 24) Gros-Doucet et F. Gros: Inhibition sélective de la biosynthèse d'une enzyme bactérien par la pénicilline. *C.R. Acad. Sci., Paris* 238, 2267, 1954
- 25) Hansen: *Zentralblatt f. Bact. I. org.* 115, 338, 1930
- 26) Hotchkiss, R. D.: Induction of penicillin resistance by transformation. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 28, 346, 1952
- 27) Jacobsohn, K. P. et M. D. de Azevedo: Action d'antibiotiques sur une peptidase et sur l'urease. *C.R. Soc. Biol., Paris* 148, 199, 1953
- 28) Jacobsohn, K. P. et M. D. de Azevedo: Mode d'action des antibiotiques sur plusieurs enzymes animaux. *Exp. Med. Surg.* 11, 149, 1953
- 29) Jacobsohn, K. P. et M. D. de Azevedo: Action de plusieurs antibiotiques sur des déshydrases et sur la fumarase bactérienne. *C.R. Soc. Biol. Paris* 148, 1712, 1954
- 30) Jacobsohn, K. P. und J. Mirabeau-Cruz: zit. in Jacobsohn und Azevedo. *Exp. Med. Surg.* 11, 149, 1953; *Arqu. portug. Sci. Biol. Suppl.* 10, 23, 1948

- 31) Karrer, P. und V. Viscontini: Einfluß verschiedener Zusätze auf die Wirksamkeit der Cocarboxylase. *Helv. Chim. Acta.* 30, 268, 1947
- 32) Kogut, M., Pollock, M.R. und Tridgell, E.J.: Enzyme formation. *Biochem. J.* 62, 391, 1956 zit. in *Enzymes*. M. Dixon and E. C. Webb. Longmans, Green and Co. London/New York/Toronto. S. 510, 518 - 520
- 33) Lambin, S. et A. Devignes: Influence de quelques substances antibactériennes sur la phénomène de phagocytose. *Ann. Inst. Pasteur* 84, 131, 1948
- 34) Leuthard, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie. 13. Auflage. Walter de Gruyter & Co. Berlin W, 379, 1957
- 35) Leuthard, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie. 13. Auflage. Walter de Gruyter & Co. Berlin W, 390, 1957
- 36) Locker, A. und K. H. Spitzzy: Über die Beziehungen zwischen Penicillinaktivierung und Gewebsatmung der Leber. *Z. ges. exp. Med.* 125, 100, 1955
- 37) Loomis, W. F.: On mechanism of action of aureomycin. *Science* 111, 474, 1950
- 38) Macheboeuf, M, F. Gros: Exp. Ann. Biochim. méd. Paris 12, 1951 zit.: Carr et Macheboeuf: L'action de la pénicilline sur le métabolisme protidique dans les cellules proliférantes des bactéries. *Ann. Inst. Pasteur* 87, 708, 1954
- 39) Markowitz, J., A. Rappaport, A. C. Scott: Die Funktion der Leberarterie bei Hunden. *American Journal of Digestive Diseases*. Vol. 16, 344, 1944
- 40) McCullough, U. B., and G. A. Beal: Antimetabolic action of sulfadizine and certain antibiotics for *Brucella*. *J. infect. Dis.* 90, 196, 1952
- 41) Van Meter, I. C., and J. J. Oleson: Effect of aureomycin on respiration of normal rat liver homogenates. *Science* 113, 273, 1951
- 42) Van Meter, I. C., A. Spector, J. J. Oleson und J. H. Williams: In vitro action of aureomycin on oxydative phosphorylation in animal tissues. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 81, 215, 1952
- 43) Mirabeau-Cruz, J. et K. P. Jacobsohn: Action de la streptomycine sur plusieurs enzymes. *C.R. Soc. Biol. Paris*, 143, 1629, 1949
- 44) Mosonyi, L.: Die Wirkung der Antibiotika auf die Zellen. *Antibiotica et Chemotherapia*. Vol. 5, 230 - 299, 1958. Karger, Basel/New York
- 45) Olitzki, A. L.: Hydrogensulphide production by non multiplying organisms and its inhibition by antibiotics. *J. gen. Microbiol.* 11, 160, 1954

- 46) Owen, Ch. A. jr., A. G. Karlson, and E. A. Zeller: Enzymologie of tubercle bacilli and other mycobacteria. J. Bact. 62, 53, 1951
- 47) Pollock, M. R.: Enzyme formation. Brit. J. exp. Path. 31, 739, 1950, zit. in Enzymes. M. Dixon and E. C. Webb. Longmans, Green and Co. London/New York/Toronto. S. 510, 518 - 520
- 48) Pollock, M. R. und Perret, C. J.: Enzyme formation. Brit. J. exp. Path. 32, 387, 1951, zit. in Enzymes. M. Dixon and E. C. Webb. Longmans, Green and Co. London/New York/Toronto. S. 510, 518 - 520
- 49) Van Potter, R., and A. E. Reif: Inhibition of an electron transport component by antimycin. J. Bact. 61, 259, 1954
- 50) Roulet, F., and E. A. Zeller: Über die Diaminoxydase der Smegmabazillen. Helv. Chim. Acta. 28, 1396, 1945
- 51) Sanyal, S. M.: On streptomycin. Calcutta med. J. 48, 337, 1951
- 52) Sawelsberg, W. und J. Ströder: Über den Einfluß bestimmter Antibiotika und Chemotherapeutika auf die Gewebsatmung. Schweiz. med. Wschr. 82, 140, 1952
- 53) Saz, A. K., and R. B. Slie: Reversal of aureomycin inhibition of bacterial cell-free nitroreductase by manganese. J. biol. Chem. 210, 407, 1954
- 54) Saz, A. K., and R. B. Slie: The inhibition of organic nitroreductase by aureomycin in cell-free extracts. Arch. Biochem. 210, 407, 1954
- 56) Umbreit, W. W., and U. E. Tonkazy: The action of streptomycin in tissue homogenates. J. Bact. 58, 769, 1949
- 57) Umbreit, W. W.: Mode of action of the antibiotics. Amer. J. med. 18, 717, 1955
- 58) Umbreit, W. W., Ph. Schmidt, and E. W. Oginsky: The Formation of citrate. J. Bact. 61, 595, 1951
- 59) Váczi, L., K. Gál und M. Kubinyi: Über die Eigenschaften der chloramphenicol resistenten E. coli-Stämme. Hung. Acta microbiol. 2, 359, 1955
- 60) Wagner, H. -J.: Habilitationsschrift. Medizinische Fakultät Mainz 1960
- 61) Wagner, H. -J. und G. Gillisen: Bakteriologische Untersuchungen an Tieren nach vorausgegangener Antibiotika- und Sulfonamidbehandlung. Path. Microbiol. 23, 311 - 322, 1960. S. Karger, Basel/New York
- 62) Wong, D. J. O., S. Barban, and S. J. Ajl: Inhibition of respiration by aureomycin and terramycin. Antib. Chemother. 3, 607, 1953

- 63) Zeller, E. A., Ch. A. Owen jr., and A. G. Karlson: Diaminoxidase of mycobacterium smegmatis: Effect of streptomycin and dihydrostreptomycin. J. biol. Chem. 188, 623, 1951

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. K l i e w e danken, der es mir ermöglichte, im Hygiene-Institut zu arbeiten.

Herrn Professor Dr. Dr. Gillissen danke ich für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. T ö l g aus dem Anorganisch-chemischen Institut für die wertvolle Unterstützung bei der quantitativen Analyse des Schwefelwasserstoffs.

LEBENS LAUF

Am 4. August 1936 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Josef Olbermann und seiner Ehefrau Margarete, geb. Finkeldey, in Koblenz geboren. 1942 trat ich in die Volksschule in Bacharach ein. Von 1946 bis 1956 besuchte ich das Stefan George-Gymnasium in Bingen und legte dort im Februar 1956 meine Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1956 begann ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz mein Medizinstudium. Im Herbst 1958 bestand ich dort das Physikum. Ich habe die Absicht, im Herbst 1961 das Medizinische Staatsexamen in Mainz zu machen.

